METODELE LABORATORULUI CLINIC

EDITURA MEDICALĂ

METODELE
LABORATORULUI
CLINIC

METODELE LABORATORULUI CLINIC

AUTORII:

Dr. I. ALTERAȘ, conf. N. CAJAL, dr. I. COJOCARU, dr. S. COMOROȘAN, dr. P. DĂNCESCU, dr. T. IEREMIA, dr. V. KONDI, chim. NATALIA MITRICĂ

EDITURA
MEDICALĂ
BUCUREȘTI
1964

Ediția a II-a, revăzută și completată, a Manualului de laborator clinic, Editura medicală, București, 1962.

Dr. SORIN COMOROŞAN

Chim. NATALIA MITRICĂ

BIOCHIMIE MEDICALĂ

TABLĂ DE MATERII

BIOCHIMIE MEDICALĂ

Dr. SORIN COMOROŞAN şi chim. NATALIA MITRICĂ

Noţiuni sumare de chimie analitică 7
Prepararea reactivilor în laborator 7
  A. Exprimarea concentraţiei soluţiilor la greutate 8
  B. Exprimarea concentraţiei soluţiilor la volum . 9
  Titrarea soluţiilor 10
Metode fizico-chimice de analiză 22
Metode optice 22
  Refractometria 22
  Polarimetria 23
  Colorimetria 24
Metode electrice 34
  Electroforeza 34
  Imunelectroforeza 44
  pH-metrie 48
    Metoda colorimetrică 50
    Metoda electrometrică 55
  Conductometria 59
Metode cromatografice de analiză 64
Explorarea biochimică a funcţiei de digestie şi a metabolismului 80
Explorarea biochimică a stomacului 80
  Recoltarea sucului gastric 82
  Examenul macroscopic al sucului gastric 88
  Examenul microscopic al sucului gastric 88
  Explorarea biochimică a sucului gastric 89
  Examenul enzimatic al sucului gastric 91
  Analiza electroforetică a sucului gastric 94
Explorarea biochimică a intestinului 94
  Examenul macroscopic al bilei 96
  Examenul microscopic al bilei 96
  Examenul chimic al bilei 96
Sucul intestinal 98
Explorarea biochimică a colonului 99
  Examenul macroscopic 99
  Examenul microscopic 100
  Examenul chimic 101
  Examenul enzimatic 101
Explorarea biochimică a pancreasului 105
Explorarea biochimică a ficatului 106
  Rolul ficatului în metabolismul hemoglobinei şi al derivaţilor săi 107
  Rolul ficatului în metabolismul glucidic 121
  Rolul ficatului în metabolismul lipidic 137
  Ficatul şi cetogeneza 138
  Ficatul şi metabolismul lipidelor complexe . . . 140
  Ficatul şi metabolismul colesterolului 141
  Rolul ficatului în metabolismul proteic 146
Explorarea biochimică a funcţiei de excreţie 172
Explorarea biochimică a funcţiilor rinichiului . . . 172
  Explorarea biochimică a funcţiei de excreţie . . 172
  Explorarea biochimică a epurării plasmatice . . . 192
  Explorarea biochimică a funcţiei de menţinere a echilibrului osmotic 201
  Funcţia de menţinere a echilibrului acido-bazic . 206
Explorarea biochimică a umorilor 210
Sîngele 210
  Enzimele serice 210
  Componente organice 231
  Componente anorganice 237
Lichidul cefalorahidian 250
Secreţii, transsudate, exsudate 254
  Laptele 254
  Lichidele patologice de puncţie 256

HEMATOLOGIE

dr. KONDI VANGHEL

Explorarea seriei eritrocitare 263
  I. Tehnici 263
    Recoltarea singelui pentru examene morfologice 263
    Examenul singelui proaspăt 264
    Numărătoarea eritrocitelor 264
    Dozarea hemoglobinei 267
    Tehnici pentru determinarea diferitelor tipuri de hemoglobine 270
    Hematocritul 271
    Determinarea volumului sanguin 275
    Diametrul eritrocitar 276
    Constante eritrocitare derivate. Indici 278
    Rezistenţa globulară 280
    Viteza de sedimentare a eritrocitelor 283
    Metode de colorare şi reacţii citochimice de explorare a seriei eritrocitare 284
  II. Studiul morfologic al seriei eritrocitare . . . 288
    Morfologia seriei eritrocitare normale 288
    Patologia seriei eritrocitare 290
      Seria eritrocitară patologică 295
  III. Afecţiunile seriei eritrocitare 297
    Anemiile 297
    Poliglobuliile 310

Eritremiile 311
Porfirinurii și porfirii 312
Explorarea seriei leucocitare și trombocitare 315
I. Tehnici 315
Numărătoarea leucocitelor 315
Numărătoarea trombocitelor 317
Examenul morfologic al sîngelui 318
Formula leucocitară 320
Evidențierea granulațiilor toxice ale neutrofilelor 321
Punerea în evidență a peroxidazelor și oxidazelor 321
Colorația cu albastru de toluidină pentru bazofile 322
Cercetarea fosfatazei alcaline 322
Reacția Feulgen 323
Evidențierea acidului ribonucleic 324
II. Studiul morfologic al seriei leucocitare 325
Seria granulocitară normală 325
Patologia celulelor seriei granulocitare 329
Seria limfocitară normală 331
Patologia celulelor seriei limfocitare 332
Seria monocitară normală 332
Patologia celulelor seriei monocitare 333
Seria trombocitară normală 334
Patologia celulelor seriei trombocitare 335
III. Afecțiunile seriei leucocitare 335
Leucoza mieloidă cronică 335
Leucoza limfoidă cronică 338
Leucozele acute 339
Leucopenii. Granulocitopenii. Pancitopenii 344
Boala de iradiație 347
Hipersplenismul și hiposplenismul 349
Citopenii distrofice congenitale 350
Mononucleoza infecțioasă 351
Examenul sîngelui periferic. Hemograma 354
A. Variații fiziologice ale numărului elementelor sîngelui periferic 354
B. Variații patologice ale numărului elementelor sîngelui periferic 355
Examenul organelor hematopoetice 356
I. Puncția medulară (Arinkin) 356
Mielograma 358
II. Puncția ganglionară 362
III. Puncția splenică 364
IV. Puncția ficatului 364
Sistemul reticulo-histiocitar 366
Morfologia celulelor sistemului reticulo-histiocitar din măduva hematogenă 367
Funcțiile sistemului reticulo-histiocitar 369
Afecțiunile sistemului reticulo-histiocitar 370
Reticuloze hiperplazice tumorale. Tumorile organelor hematopoetice 372
Reticuloze granulomatoase 377
Reticuloze acumulative 378
Sarcoleucozele 379
Reticuloze acute sau reticulo-endotelioze acute 380
Macroglobulinemia 380
Studiul hemostazei 384
I. Factorii coagulării 384
II. Mecanismul hemostazei 387
Timpii hemostazei 387
Fenomenul autocatalitic al hemostazei 390
III. Tehnici 392
Recoltarea sîngelui 392
Studiul coagulabilității globale 395
Studiul hemostazei legată de vas 398
Studiul primei faze a coagulării 400
Studiul fazei a doua a coagulării 404
Studiul fazei a treia a coagulării 408
Diagnosticul de laborator al unui sindrom proteolitic 409
Trombelastografia 413
Trombelastograma în studiul sindroamelor hemoragice 417
IV. **Sindroamele hemoragice** 426
A. Sindroamele hemoragice prin deficiența în factori plasmatici 426
B. Sindroamele hemoragice de origine trombocitară 436
C. Sindroamele hemoragice datorite unei alterări a rezistenței capilare 439
D. Factorii inhibitori ai coagulării 440
E. Sindroamele purpurice 446
Serologia imunohematologică 449
I. Anticorpi antieritrocitari 449
A. Cercetarea izoanticorpilor antieritrocitari 449
B. Cercetarea autoanticorpilor antieritrocitari 455
II. Anticorpi antileucocitari 459
A. Izoanticorpi antileucocitari 459
B. Autoanticorpi antileucocitari 460
III. Autoanticorpi antitrombocitari 463
A. Izoanticorpi antitrombocitari 463
B. Autoanticorpi antitrombocitari 463
IV. Cercetarea aglutininelor eterofile 464
V. Tehnici neimunologice de studiu ale anemiilor hemolitice 465

BACTERIOLOGIE

Dr. IEREMIA TIBERIU

Metodele generale de studiu al bacteriilor 472
Microscopul și metodele de microscopie întrebuințate în microbiologie 472
Metodele examenului microbilor pe preparate native și colorate 487
Metodele de sterilizare și dezinfecție 495
I. Sterilizarea prin agenți fizici 495
II. Antisepsie și dezinfecție 503
Metode de cultivare a microbilor — Mediile de cultură 504
Metode de recoltare, conservare și transport pentru produsele patologice 524
Metode de însămînțare și izolare a microbilor 530
Metode imunologice de diagnostic 538
Metode de izolare și de identificare a microbilor patogeni prin conferirea infecției experimentale 559
Determinarea sensibilității la antibiotice și chimioterapice a microbilor patogeni aerobi (antibiograma) 567
Determinarea concentrației antibioticelor și chimioterapicelor în sînge și umori 574
Diagnosticul de laborator în infecțiile microbiene 580
Relațiile ecologice ale organismului uman cu flora mediului înconjurător. Flora normală a organismului 580
Examenul bacteriologic al produselor patologice din infecțiile umane 585
Diagnosticul infecțiilor cu coci patogeni 601
Diagnosticul de laborator al infecțiilor stafilococice 601
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu microbi din genul *Gaffkya* și *Sarcina* 608
Diagnosticul de laborator al infecțiilor pneumococice 612

Diagnosticul de laborator al infecțiilor streptococice . . . 617
Diagnosticul de laborator al infecțiilor provocate de Neisserii . . . 629
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *Corynebacteriaceae* . . . 636
Diagnosticul de laborator al difteriei . . . 647
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu micobacterii . . . 649
Diagnosticul infecției tuberculoase . . . 649
Diagnosticul de laborator al leprei . . . 664
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu microbi din genul *Haemophylus* . . . 669
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu microbi din genul *Bordetella* . . . 672
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *Enterobacteriaceae* . . . 676
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu colibacili 677
Diagnosticul de laborator în infecțiile cu bacterii din genul *Klebsiella* . . . 681
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu microbi din genul *Proteus* . . . 684
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu piocianic . . . 686
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *Salmonella* . . . 689
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu bacterii din genul *Shigella* . . . 701
Diagnosticul de laborator al holerei . . . 708
Diagnosticul de laborator în intoxicațiile alimentare produse de bacterii . . . 714
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu spirochete . . . 721
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *Borellia* 730
Diagnosticul de laborator al leptospirozelor . . . 731
Diagnosticul de laborator al infecției cărbunoase 741
Diagnosticul de laborator al infecției morvoase . 745
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu bacterii din genul *Pasteurella* . . . 747
Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *Brucella*. 753
Bacterii de importanță secundară pentru patologia infecțioasă umană . . . 761
Diagnosticul de laborator al infecțiilor provocate de microbii anaerobi . . . 763
Diagnosticul de laborator al toxiinfecției tetanice 766
Diagnosticul de laborator al intoxicației botulinice . . . 770
Diagnosticul bacteriologic al gangrenei gazoase 773
Bacteriile anaerobe netelurice care prezintă importanță pentru patologia infecțioasă umană . . 777
Determinarea spectrului de sensibilitate la antibiotice a bacteriilor anaerobe . . . 782

PARAZITOLOGIE

Dr. DĂNCESCU PAUL

Introducere . . . 789
Metodele generale pentru diagnosticul parazitozelor și identificarea paraziților . . . 790
Singele . . . 790
Sputa . . . 791
Urina . . . 792
Secreția vaginală . . . 792
Sucurile digestive și scaunul . . . 792
Formațiuni tumorale . . . 796
Pielea . . . 796
Mușchii . . . 796
Bolile parazitare și paraziții omului . . . 797
Încrengătura protozoare . . . 797
Clasa rizopode . . . 797
Clasa flagelate . . . 805
Clasa sporozoare . . . 816
Clasa ciliate . . . 825
Încrengătura plathelminți . . . 826
Fascioloza . . . 827
Dicrocelioza . . . 830
Opistorchoza . . . 831
Clonorchoza . . . 831
Paragonimoza . . . 831
Schistosomoza . . . 832
Tenioza și cisticercoza . . . 832
Hidatidoza . . . 837
Himenolepidoza . . . 840
Dilepinidoza . . . 843
Botriocefaloza . . . 843
Sparganoza . . . 846
Încrengătura nemathelminți . . . 846
Trichinoza sau trichineloza . . . 847
Tricocefaloza . . . 849
Strongiloidoza . . . 851
Anchilostomoza . . . 854
Pseudomiaza . . . 857
Oxiuroza . . . 857
Ascaridioza . . . 859
Alte nematode parazite . . . 863

MICOLOGIE

dr. ALTERAȘ ISAC și dr. COJOCARU ION

Generalități . . . 871
Recoltarea materialului patologic . . . 872
Cercetarea micologică a materialului patologic . . 875
Examenul direct . . . 875
Diagnosticul prin culturi . . . 883
Mijloace ajutătoare în diagnosticul de laborator al micozelor . . . 907
Antibiograma fungică . . . 910

INFRAMICROBIOLOGIE

Conf. NICOLAE CAJAL

Aspecte generale privind diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane . . . 921
Tehnici mai frecvent folosite în diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor . . . 938
Recoltarea materialului infecțios . . . 938
Transportul produselor patologice . . . 941
Tehnici mai frecvent folosite pentru izolarea inframicrobilor . . . 942
Inocularea la animale de laborator . . . 942
Inocularea în oul embrionat de găină . . . 957
Inocularea în culturi celulare . . . 963
Metode de conservare a inframicrobilor . . . 976
Metode folosite mai frecvent pentru evidențierea inframicrobilor pe frotiuri și secțiuni . . . 978
Tehnici serologice folosite curent în diagnosticul unor inframicrobioze . . . 986
Reacția de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare . . . 987
Reacția de aglutinare la rece . . . 993
Reacția de hemaglutinare Hăngănuțiu-Paul-Bunnell-Davidsohn . . . 994

Reacția de fixare a complementului 997
Reacția de neutralizare 1005
Reacția de aglutinare a corpusculilor elementari 1009
Seroreacția Weil-Felix 1011
Tehnica anticorpilor fluorescenți 1013

Inframicrobioze al căror diagnostic este mai frecvent cerut laboratorului 1017

Diagnosticul principalelor viroze ale aparatului respirator 1017
Diagnosticul gripei 1018
Diagnosticul guturaiului 1024
Diagnosticul afecțiunilor respiratorii provocate de adenovirusuri 1025
Diagnosticul infecțiilor cu virusuri paragripale . . 1028
Diagnosticul unei pneumonii inframicrobiene . . 1030
Diagnosticul „pneumoniei atipice primare" (P.A.P.) 1030
Diagnosticul ornitozei 1031
Diagnosticul tifosului pulmonar (febra „Q") . . . 1035
Diagnosticul unor meningite cu lichid clar de natură inframicrobiană 1040
Diagnosticul coriomeningitei limfocitare 1041
Diagnosticul meningitelor provocate de virusuri encefalitice 1044
Diagnosticul unei meningite urliene 1049
Diagnosticul unei meningite herpetice 1053
Diagnosticul altor meningite virotice 1056
Diagnosticul infecțiilor provocate de enterovirusuri 1057
Diagnosticul poliomielitei 1057
Diagnosticul infecțiilor Coxsackie 1062
Diagnosticul infecțiilor produse de virusuri ECHO 1066
Diagnosticul de laborator al hepatitelor epidemice inframicrobiene 1071
Diagnosticul mononucleozei infecțioase 1075
Diagnosticul de laborator al turbării 1077
Diagnosticul tifosului exantematic 1084
Index alfabetic 1089

Redactor responsabil: dr. ALGEORGE GEORGE
Tehnoredactor: TRÎMBIȚIONI RUTH

Dat la cules: 20.12.1963. Bun de tipar: 11.05.1964. Apărut: 1964. Tiraj: 4.500+170 ex. legate. Hîrtie: velină de 80 g/m² 540×810/8. Coli editoriale: 122,56. Coli de tipar: 112. Planșe tipar tipo 5. A.: 13951/1963. C.Z. pentru bibliotecile mari: 616—071/078. C.Z. pentru bibliotecile mici: 616—071/078.

Intreprinderea poligrafică Informația, str. Brezoianu 23—25, București R.P.R., comanda 5191

01

NOȚIUNI SUMARE DE CHIMIE ANALITICĂ

În laboratorul clinic, sîntem puși în fața necesității de a lucra cu soluții de reactivi bine determinați.

Cu ajutorul lor se cere să stabilim elementele care intră în compoziția unei anumite substanțe sau a unor amestecuri, ceea ce se numește *analiză calitativă*, sau să determinăm exact *conținutul* în elemente, dintr-un compus oarecare, ceea ce numim *analiză cantitativă*.

Pentru executarea acestor variate analize trebuie să preparăm reactivi, după anumite reguli deosebit de stricte.

PREPARAREA REACTIVILOR ÎN LABORATOR

Sticlăria cu ajutorul căreia se măsoară volumele (pipetele, baloanele cotate, cilindrii, biuretele) nu poate fi utilizată decît foarte curată și uscată.

Spălarea se face cu apă, uneori adăugîndu-se cenușă sau detergenți (Alba), iar clătirea lor, cu 2—3 jeturi de apă distilată.

Sticlăria se usucă pe stative speciale sau în etuva electrică (la 100°). Pentru îndepărtarea grăsimii se întrebuințează *amestecul sulfocromic*:

100 g bicromat de potasiu ($K_2Cr_2O_7$)
1000 ml acid sulfuric concentrat (H_2SO_4).

Bicromatul se triturează într-un mojar, adăugîndu-se cu precauție acidul.

Amestecul sulfocromic se lasă în vasul de măsurat un timp variabil — după necesități —, apoi se îndepărtează, iar urmele sînt spălate cu grijă, prin jeturi repetate de apă.

La determinarea foarte exactă a volumelor nu se vor utiliza decît vase verificate (care au gradate pe ele capacitatea și temperatura de lucru). De obicei, gradarea se face pentru 20°.

Dacă nu avem certitudinea că vasul de sticlă pe care îl utilizăm este exact, putem să-l verificăm în felul următor: umplem vasul (balon cotat, de exemplu) cu apă și cîntărim volumul său. Astfel lichidul dintr-un balon de 500 ml va trebui să cîntărească la +4°, 500 g, deoarece la +4° densitatea apei este 1,000 000.

Luîndu-se aceste precauții, se pot prepara soluțiile necesare analizelor curente, cu exactitate satisfăcătoare. Dizolvantul cel mai întrebuințat în practica de toate zilele a laboratorului este apa distilată.

TABELUL 1

Corecția pentru densitatea apei la diferite temperaturi

Temperatura	D	T°	D	T°	D	T°	D	T°	D
+0,0	0,999 868	7	0,999 929	14	0,999 271	21	0,998 019	28	0,996 259
1	0,999 927	8	0,999 876	15	0,999 126	22	0,997 797	29	0,995 971
2	0,999 968	9	0,999 808	16	0,998 970	23	0,997 565	30	0,995 673
3	0,999 992	10	0,999 727	17	0,998 801	24	0,997 323	31	0,995 367
4	1,000 000	11	0,999 632	18	0,998 622	25	0,997 071	32	0,995 052
5	0,999 992	12	0,999 525	19	0,998 432	26	0,996 810	33	0,994 729
6	0,999 968	13	0,999 404	20	0,998 230	27	0,996 539	34	0,994 398

Apa distilată se prepară într-un distilator metalic, cu debit 8–10 l/oră și conține elemente metalice ca **Cu, Zn,** Sn, Pb.

În studiul enzimatic, în microanalize, în studiul proteinelor și în prepararea soluțiilor titrate nu se recomandă întrebuințarea apei distilate, ci a apei bidistilate.

Apa bidistilată se prepară din apă distilată, în distilator constituit numai din vase de sticlă neutră, fără dopuri de cauciuc sau plută. Fierberea se face moderat, în prezența unei cantități infime de MnO_4K.

Controlul apei bidistilate constă în probele următoare:

1. *Reziduu*: pe o sticlă de ceas tarată se pun 2 ml apă. Se evaporă la 105° și se cîntărește reziduul sec. Cifra obținută se înmulțește cu 50 pentru exprimarea rezultatelor la % ml. Apa bidistilată nu conține reziduu.

2. *pH* – 5,8–6,2.

3. *Substanțele organice*: într-un Erlenmeyer se pun 50 ml apă bidistilată și 0,5 ml acid sulfuric 10%. Se încălzește la fierbere, se adaugă o picătură dintr-o soluție de permanganat de potasiu 1%. Culoarea violacee trebuie să persiste timp de 3 minute.

4. *Substanțele anorganice*:

a) *Cloruri.* La 10 ml apă distilată se adaugă o picătură de acid azotic 10% și 3–4 picături dintr-o soluție 1% nitrat de argint. Nu trebuie să prezinte opalescență; în lipsa clorului nu se formează clorura de argint.

b) *Sulfați.* 10 ml apă distilată cu 2 picături acid clorhidric concentrat și 2 picături dintr-o soluție clorură de bariu 10%; rămîne limpede. Lipsind $SO_4^{=}$ nu se formează sulfat de bariu.

c) *Calciu.* 10 ml apă distilată, plus 1 ml soluție oxalat de amoniu 4%; nu prezintă opalescență. Lipsind calciul, nu se formează oxalatul de calciu.

d) *Cuprul.* Se pune în evidență cu reactivul format din fenolftaleină, 2 g; hidrat de potasiu, 21 g; apă distilată, 100 ml. După dizolvarea substanțelor se adaugă soluției obținute 10 g pudră de zinc pentru decolorarea reactivului. La 10 ml apă se adaugă 4 picături de reactiv și o picătură de apă oxigenată. Prezența cuprului dă o tentă roz care trece în roșu. Viteza de apariție a tentei depinde de cantitatea de cupru din probă.

SOLUȚII DE REFERINȚĂ

Pentru a putea determina diferitele componente ce se caută într-un produs biologic analizat, trebuie să lucrăm cu soluții de referință, care să reacționeze cu compusul respectiv și a căror concentrație să fie perfect stabilită.

Concentrația unei soluții este definită drept cantitatea de substanță dizolvată într-o anumită cantitate de soluție. Exprimarea concentrațiilor se poate face în două feluri:

A. Exprimarea la greutate.
B. Exprimarea la volum.

A. EXPRIMAREA CONCENTRAȚIEI SOLUȚIILOR LA GREUTATE

În acest caz se referă cantitatea de substanță dizolvată, exprimată în greutate, la cantitatea de solvent, exprimată tot în greutate. Notația este g/g (greutate la greutate) sau notația internațională w/w (*weight* = *greutate*).

Modul cel mai utilizat în laborator este *concentrația procentuală*, care exprimă cantitatea de substanță dizolvată în 100 g solvent.

La prepararea soluțiilor de acizi tari – în concentrație procentuală, pentru a evita cîntărirea se face trecerea la volum după formula clasică:

$$V = \frac{g}{D}$$

V = volumul;
g = greutatea,
D = densitatea.

Exemplu: se prepară o soluție de SO_4H_2 15% din soluția concentrată de SO_4H_2 96% D = 1,84.

96 g SO_4H_2 sînt cuprinse în 100 g SO_4H_2 concentrat.

15 g SO_4H_2 sînt cuprinse în $X = \frac{15 \cdot 100}{96} =$ $= 15{,}62$ g.

Deci 15 g de acid sulfuric se găsesc în 15,62 g soluție SO_4H_2 concentrată.

Aplicînd formula $V = \frac{g}{D} = \frac{15{,}62}{1{,}84} = 8{,}3$ ml.

Deci, în 8,3 ml SO_4H_2 96% există 15 g SO_4H_2.

Adăugînd acest volum de 8,3 ml la 85 g apă distilată, se obține soluția de 15%.

Apa distilată nu se cîntărește, ci se măsoară la volum

$$1 \text{ ml} = 1 \text{ g}.$$

La temperaturi diferite de +4° se face corecția de densitate după tabelul 1.

B. EXPRIMAREA CONCENTRAȚIEI SOLUȚIILOR LA VOLUM

Cele mai utilizate moduri întîlnite în laboratorul clinic sînt prin:

1. EXPRIMAREA CONCENTRAȚIEI SOLUȚIILOR PRIN CONCENTRAȚIA MOLARĂ

Se numește soluție molară soluția care conține la 1 000 ml o moleculă-gram de substanță. Se numește moleculă-gram cantitatea de substanță în grame egală cu greutatea moleculară a substanței respective. Cînd se cunoaște cantitatea de substanță din 1 000 ml soluție, se poate calcula molaritatea după formula:

$$m = \frac{g \cdot \text{substanță la 1 000 ml}}{\text{greutatea moleculară}}$$

2. EXPRIMAREA CONCENTRAȚIEI SOLUȚIILOR PRIN CONCENTRAȚIA ECHIVALENTĂ

Se numește soluție normală, soluția care conține la 1 000 ml un echivalent-gram de substanță. Se numește echivalent-gram cantitatea de substanță în grame echivalentă cu greutatea unui atom de hidrogen.

Pentru prepararea soluțiilor normale se determină echivalentul respectiv împărțind greutatea moleculară la valență, se înmulțește cu normalitatea dorită și se aduce la 1 000 ml soluție:

$$\frac{\text{greutatea moleculară}}{\text{valență}} \times N = g \text{ substanță la 1 000 ml}$$

soluție.

Dacă se cunoaște normalitatea unei soluții, se poate trece ușor la prepararea unui volum dorit, *de o normalitate inferioară*, după formula:

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

$V_1 = \frac{N_2 V_2}{N_1}$, în care: N_1 = normalitatea soluției cunoscute;

V_1 = volumul de calculat;

N_2 = normalitatea soluției cerute;

V_2 = volumul cerut.

3. EXPRIMAREA CONCENTRAȚIEI SOLUȚIILOR PRIN TITRU

Se numește *titrul unei soluții* cantitatea de substanță exprimată în grame, conținută într-un ml de soluție. Notația sa este T.

Prepararea soluțiilor titrate se face în două feluri:

a) Se cîntărește la balanța analitică foarte exact o cantitate din substanță și se dizolvă la balon cotat.

b) Cînd substanța luată în lucru nu se poate cîntări ușor și exact (nu îndeplinește condițiile unei substanțe etalon), se titrează cu ajutorul unei alte substanțe. Se cîntărește din aceasta o cantitate precisă și se titrează cu soluția al cărei titru vrem să-l determinăm.

Cunoscînd titrul unei soluții, putem afla normalitatea sa după formula:

$$N = \frac{T \cdot 1\,000}{\text{echivalentul-gram}}$$

Soluțiile a căror concentrație se cunoaște în mod foarte exact se numesc *titrate*. Cele a căror concentrație nu corespunde precis cantității de substanță se numesc *aproximative*.

În laborator se lucrează, deseori, cu soluții de concentrație aproximativă, ele fiind mult mai ușor de preparat.

Utilizarea lor se face însă numai după stabilirea *factorului* (F), uneori numit și *coeficient de rectificare* (k), care ne permite să trecem de la un anumit volum de soluție aproximativă la soluția de concentrație exactă.

Factorul reprezintă raportul între titrul real al soluției și titrul său teoretic:

$$F = \frac{T \text{ real}}{T \text{ teoretic}}$$

Din soluțiile de normalitate aproximativă, ca $F > 1$, se pot obține prin diluare soluții de normalitate exactă, după formula:

$$X = \frac{V \cdot G \cdot 10^{-\text{pn}}}{1\,000 \cdot T},$$

în care:

X = volumul de soluție aproximativă care urmează a fi diluat pentru obținerea soluției de normalitate exactă;

V = volumul ce urmează a se obține;

G = echivalentul-gram al substanței;

$10^{-\text{pn}}$ = normalitatea;

T = titrul.

Exemplu: se prepară 500 ml de soluție NaOH 10^{-1n} dintr-o soluție cu $F = 1{,}1$ și titru 0,004 4.

În acest caz : $V = 500$ ml;
$G = 40$;
$10^{-pn} = 0,1$;
$T = 0,004\,4$.

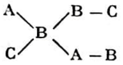
$$X = \frac{500 \times 40 \times 0,1}{4,4} = 454,4.$$

4. EXPRIMAREA CONCENTRAŢIILOR SOLUŢIILOR PRIN CONCENTRAŢIA PROCENTUALĂ ÎN VOLUME

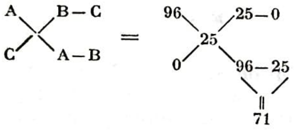
În acest caz se referă cantitatea de substanţă dizolvată, exprimată în volum, la cantitatea de solvent, exprimată tot în volum. Notaţia este V/V.

Pentru calcularea diferitelor volume se utilizează aşa-numita regulă a amestecurilor:

Cînd se cere a se prepara dintr-un compus oarecare de concentraţie A un compus de concentraţie B cu ajutorul unui compus de concentraţie C, se aplică regula amestecurilor:



Exemplu: se cere prepararea unei soluţii de alcool 25% (B) din alcool 96% (A). În acest caz 25 ml alcool 96% sînt diluaţi cu 71 ml apă distilată. Aceste proporţii au fost calculate după formula amestecurilor



TITRAREA SOLUŢIILOR

Se numeşte titrare determinarea concentraţiei unei substanţe cu ajutorul unei soluţii de concentraţie cunoscută din altă substanţă.

Pentru a putea executa corect o titrare, sînt necesare următoarele condiţii:

1. să se cunoască precis concentraţia uneia din cele două substanţe care reacţionează;
2. să se măsoare exact volumele soluţiilor care intră în reacţie;
3. să se stabilească precis sfîrşitul reacţiei sau ceea ce numim punct de echivalenţă, care se determină cu ajutorul indicatorilor. Indicatorii sînt substanţe care în apropierea punctului de echivalenţă îşi schimbă în mod evident culoarea sau aspectul.

Dăm, în cele ce urmează, *prepararea soluţiilor* mai utilizate în laboratorul clinic.

Acid sulfuric normal (SO_4H_2 N)

Soluţia conţine 49,04 g acid sulfuric la 1 000 ml.

28 ml acid sulfuric concentrat p. a. care conţin 49,08 g acid sulfuric sînt turnaţi într-un balon cotat, cu precauţie, peste 500 ml apă distilată. Amestecul se răceşte şi se completează pînă la 1 000 ml cu apă distilată. Soluţia preparată aproximativ se controlează titrimetric cu soluţie de carbonat de sodiu sau hidrat de sodiu în prezenţa roşului de metil ca indicator. Soluţiile de referinţă trebuie să fie perfect normale.

Pentru 10 ml acid sulfuric N s-au utilizat 11,2 ml hidrat de sodiu N. Deci la 10 ml din soluţia acidă trebuie adăugat 1,2 ml apă distilată pentru a obţine o soluţie de acid sulfuric N. La 1 000 ml se adaugă 120 ml apă distilată.

În cazul cînd soluţia de titrat este mai diluată, se va corecta prin adăugarea unei soluţii concentrate şi apoi se va proceda la titrare ca mai sus.

Acid sulfuric N/10 (SO_4H_2 N/10)

Soluţia conţine 4,909 g acid sulfuric la 1 000 ml. Soluţia de acid sulfuric n/10 se obţine prin diluarea soluţiei normale de acid sulfuric. Într-un balon cotat de 1 000 ml se pun 100 ml acid sulfuric N şi apoi se completează la semn cu apă distilată. Completarea se face la 15°. Soluţia diluată va fi verificată cu ajutorul unei soluţii de hidroxid de sodiu N/10.

Acid clorhidric normal (HCl N)

Soluţia conţine 36,465 g acid clorhidric la 1 000 ml.

85 ml acid clorhidric *fumans* D 1,19, care conţin 36,465 g HCl sînt diluaţi cu apă distilată la 1 litru în balon cotat. Soluţia obţinută este controlată în acelaşi mod ca acidul sulfuric.

Acid clorhidric N/10 (HCl N/10)

Soluţia conţine 3,645 6 g acid clorhidric la 1 000 ml. Se prepară prin diluarea acidului clorhidric N cu apă distilată. Într-un balon cotat de 1 litru se pun 100 ml acid clorhidric N şi apoi se completează pînă la 1 000 ml cu apă distilată. Soluţia obţinută se verifică cu soluţie de hidroxid de sodiu N/10 sau cu soluţii de carbonat de Na N/10.

Hidrat de sodiu normal (NaOH N)

Soluţia conţine 40 g hidrat de sodiu la 1000 ml.

Într-un balon Pyrex se cîntăresc 40 g hidrat de sodiu *pro analisi* la care se adaugă 100 ml apă distilată fiartă şi răcită pentru îndepărtarea CO_2. Balonul se astupă cu un dop şi se agită pînă la dizolvare. Vasul cu soluţia caldă se răceşte, lăsîndu-l la temperatura camerei. Soluţia se trece într-un balon cotat de 1 litru şi se completează la semn tot cu apă fiartă şi răcită. Soluţia se controlează cu soluţie normală de acid clorhidric sau sulfuric, în prezenţa a 2 picături de metiloranj.

Dacă 20 ml de soluţie hidrat de sodiu se titrează cu 20,3 ml acid clorhidric N, la 20 ml soluţie se adaugă 0,3 ml apă. La 1 000 ml se adaugă cantitatea de apă calculată, adică 15 ml.

Soluţiile de hidrat de sodiu N/5, N/10, N/100... se prepară prin diluarea corespunzătoare a soluţiei normale. Controlul va fi făcut cu soluţii de acizi verificate cu aceeaşi normalitate.

Tiosulfat de sodiu N/10 ($S_2O_3Na_2$ N/10)

Soluţia conţine 25 g tiosulfat de sodiu *pro analisi* la 1 000 ml. Într-un balon de 1 litru se dizolvă 25 g tiosulfat de sodiu cu 5 H_2O în apă distilată fiartă şi răcită în prealabil, pentru a îndepărta bioxidul de carbon.

Completarea pînă la semn se face tot cu apă distilată fiartă.

Soluţia obţinută se păstrează mai bine la rece şi întuneric. Titrul acestei soluţii se stabileşte cu soluţie de iodat de K N/10. Pentru aceasta se iau 25 ml de soluţie de iodat de potasiu N/10, se acidulează cu circa 10 ml SO_4H_2 10% şi se adaugă 10 ml soluţie de *iodură de potasiu* 10%. Acest amestec se titrează cu soluţia de tiosulfat de sodiu pînă la culoarea galbenă. În acest moment se adaugă 2 picături soluţie de amidon. Soluţia devine albastră. Se continuă titrarea picătură cu picătură pînă la decolorare.

Iod N/10

25 g iodură de potasiu sînt dizolvate complet în 50 ml apă distilată. Se adaugă 12,70 g iod, se agită pentru a se dizolva mai repede şi se completează cu apă distilată pînă la semnul balonului de 1 litru. Titrul se stabileşte cu soluţia de tiosulfat de sodiu N/10, indicator soluţia de amidon 1%.

Sulfocianură de potasiu N/10 (SCNK. N/10)

Soluţia conţine 9,72 g sulfocianură de potasiu în 1 000 ml.

Se cîntăreşte exact o cantitate de 10 g de sulfocianură de potasiu, se introduce într-un balon cotat de 1 litru şi se dizolvă în apă distilată. Apoi se completează pînă la semn. Titrul soluţiei se controlează cu soluţie de nitrat de argint N/10, indicator alaun feric soluţie 5% în mediu acid (NO_3H). Într-un Erlenmeyer se iau 10 ml soluţie de NO_3Ag N/10, se adaugă 20 ml apă, 5 ml alaun feric şi 58 ml acid azotic concentrat pînă la decolorarea lichidului. Apoi se titrează cu soluţie de SCNK pînă la culoarea roşie-portocalie, care persistă 30 de secunde. Normalitatea exactă se face adăugînd apa distilată necesară stabilită prin calcul.

Nitrat de argint N/10 (NO_3Ag n/10)

Soluţia conţine 16,98 g NO_3Ag la 1 000 ml.

Se cîntăresc 16,98 g de NO_3Ag şi se dizolvă într-un litru de apă distilată, într-un balon cotat. Titrul acestei soluţii se determină faţă de soluţia de ClNa N/10 în prezenţa cromatului de potasiu 5%. Soluţia de azotat de argint cu soluţia de clorură de sodiu formează clorura de argint insolubilă. Cînd toată clorura de sodiu este precipitată, cel mai mic exces de nitrat dă cu cromatul de potasiu o coloraţie roşie-brună care indică sfîrşitul titrării.

Acid oxalic N ($C_2O_4H_2$)

Soluţia conţine 63,02 g $C_2O_4H_2$ la 1 000 ml.

Se cîntăresc exact 63,02 g acid oxalic cristalizat *pro analisi* şi se dizolvă în apă distilată într-un balon cotat de 1 000 ml. Se aduce la semn. Soluția se poate păstra timp îndelungat, fiind o soluție foarte stabilă în prezența a 2–3 picături de cloroform.

Iodat de potasiu N/10 (IO_3K N/10)

Soluția conține 3,567 g iodat de potasiu la 1 000 ml.

3,567 g iodat de potasiu se dizolvă într-o cantitate mică de apă și apoi se trece într-un balon cotat de 1 000 ml. Se adaugă apă distilată pînă la semn. Se titrează cu soluție de tiosulfat N/10. Soluția își menține titrul timp nelimitat, păstrată în vase bine închise și la rece.

Sulfocianură de amoniu N/10 ($SCNNH_4$ N/10)

Soluția conține 7,61 g $SCNNH_4$ la 1 000 ml.

7,61 g de $SCNNH_4$ sînt dizolvate în 1 000 ml apă distilată la balon cotat. Se titrează cu NO_3Ag N/10 identic ca în cazul soluției de sulfocianură de K.

Carbonat de sodiu N/10 (CO_3Na_2 N/10)

Soluția conține 5,3 g CO_3Na_2 la 1 000 ml.

După calcinarea substanței se cîntăresc 5,300 g CO_3Na_2 și se dizolvă în 1 000 ml apă distilată la balon cotat.

Permanganat de potasiu N/10 (MnO_4 KN/10)

Soluția conține 3,16 g MnO_4K la 1 000 ml.

Se cîntăresc exact 3,3 g MnO_4K, se trec într-un balon cotat de 1 000 ml și se dizolvă în apă bidistilată circa 800 ml. Titrul soluției se face după 10–15 zile de la preparare. Balonul se ține la temperatura laboratorului, la întuneric. După această perioadă de stabilizare se aduce la semn prin completare cu apă bidistilată și se titrează cu soluție de acid oxalic N/10. Într-un Erlenmeyer de 50 ml se iau 10 ml acid oxalic N/10, se adaugă 10 ml acid sulfuric 20%. Se încălzește pînă la 50°, temperatură care nu trebuie depășită, deoarece se descompune acidul oxalic în prezența acidului sulfuric. Soluția caldă se titrează cu soluția de MnO_4K N/10 pînă la culoarea roz care trebuie să persiste 30 de secunde. Se repetă titrarea, se face media și se aduce la normalitatea exactă. Soluția se păstrează la întuneric.

Clorura de sodiu N/10 (ClNa N/10)

Se cîntăresc 5,8 g ClNa, care sînt dizolvate în 1 000 ml apă distilată. Substanța trebuie cîntărită repede, deoarece este higroscopică. Soluția se conservă, în prezența cloroformului, timp nelimitat.

Soluții-tampon Tris

Tris = tri-oxi-metil-amino-metan

Formula : $NH_2C\ (CH_2-OH)_3$

Greutatea moleculară = 121,14.

Soluții Stock

1. acid clorhidric N/10
2. Tris M/5

Seria de pH Tris/HCl, pH 7,2–9,10 la temperatura de 23° și pH 7,05–8,95 la temperatura de 37° se obține astfel :

La 25 ml soluție Tris M/5 se adaugă numărul de ml de acid clorhidric N/10 (tabelul 2) pentru pH fixat și apoi se aduce la 100 ml cu apă distilată.

TABELUL 2

	,00	,05	,10	,15	,20	,25	,30	,35	,40	,45	,50	,55	,60	,65	,70	,75	,80	,85	,90	,95	
7					45,0	44,3	43,6	42,9	42,0	41,3	40,6	39,8	38,8	37,8	36,7	35,5	34,2	33,0	31,6	30,3	23°
8	28,9	27,5	26,0	24,7	23,3	21,9	20,5	19,0	17,5	16,0	15,0	14,0	12,7	11,7	10,7	9,8	8,8	8,0	7,3	6,6	
9	6,0	5,5	5,0																		
7		45,0	44,3	43,6	43,0	42,2	41,5	40,7	40,0	39,9	38,0	36,8	35,7	34,5	33,3	32,0	30,6	29,2	27,8	26,4	37°
8	25,0	23,0	22,3	20,6	19,5	18,0	16,7	15,5	14,3	13,1	12,0	11,0	10,0	9,0	8,2	7,4	6,7	6,1	5,6	5,0	

Exemplu : pentru soluția pH 7,5/23° se măsoară într-un balon cotat de 100 ml, 25 ml soluție Tris M/5 + 40,6 ml acid clorhidric N/10 și se aduce la semn cu apă distilată.

TABELE ȘI NORMOGRAME DE LUCRU UTILE ÎN LABORATORUL CLINIC

Dăm în tabelul 4 și 5 densitățile acizilor tari și ale bazelor celor mai comune, utilizate în laboratorul clinic — pentru temperatura de 20° — împreună cu concentrația procentuală respectivă.

TABELUL 3

Densitatea acizilor tari pentru t=20°

Acidul sulfuric (H_2SO_4)

Acidum sulfuricum

greutatea moleculară = 98,08 H_2SO_4

Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %
1,000	0,260 9	1,180	25,21	1,360	46,33	1,540	63,81	1,720	79,37
1,005	0,985 5	1,185	25,84	1,365	46,86	1,545	64,26	1,725	79,81
1,010	1,731	1,190	26,47	1,370	47,39	1,550	64,71	1,730	80,25
1,015	2,485	1,195	27,10	1,375	47,92	1,555	65,15	1,735	80,70
1,020	3,242	1,200	27,72	1,380	48,45	1,560	65,59	1,740	81,16
1,025	4,000	1,205	28,33	1,385	48,97	1,565	66,03	1,745	81,62
1,030	4,746	1,210	28,95	1,390	49,48	1,570	66,47	1,750	82,09
1,035	5,493	1,215	29,57	1,395	49,99	1,575	66,91	1,755	82,57
1,040	6,237	1,220	30,18	1,400	50,50	1,580	67,35	1,760	83,06
1,045	6,956	1,225	30,79	1,405	51,01	1,585	67,79	1,765	83,57
1,050	7,704	1,230	31,40	1,410	51,52	1,590	68,23	1,770	84,08
1,055	8,415	1,235	32,01	1,415	52,02	1,595	68,66	1,775	84,61
1,060	9,129	1,240	32,61	1,420	52,51	1,600	69,09	1,780	85,16
1,065	9,843	1,245	33,22	1,425	53,01	1,605	69,53	1,785	85,74
1,070	10,56	1,250	33,82	1,430	53,50	1,610	69,96	1,790	86,35
1,075	11,26	1,255	34,42	1,435	54,00	1,615	70,39	1,795	86,99
1,080	11,96	1,260	35,01	1,440	54,49	1,620	70,82	1,800	87,69
1,085	12,66	1,265	35,60	1.445	54,97	1,625	71,25	1,805	88,43
1,090	13,36	1,270	36,19	1,450	55,45	1,630	71,67	1,810	89,23
1,095	14,04	1,275	36,78	1,455	55,93	1,635	72,09	1,815	90,12
1,100	14,73	1,280	37,36	1,460	56,41	1,640	72,52	1,820	91,11
1,105	15,41	1,285	37,95	1,465	56,89	1,645	72,95	1,821	91,33
1,110	16,08	1,290	38,53	1,470	57,36	1,650	73,37	1,822	91,56
1,115	16,76	1,295	39,10	1,475	57,84	1,655	73,80	1,823	91,78
1,120	17,43	1,300	39,68	1,480	58,31	1,660	74,22	1,824	92,00
1,125	18,09	1,305	40,25	1,485	58,78	1,665	74,64	1,825	92,25
1,130	18,76	1,310	40,82	1,490	59,24	1,670	75,07	1,826	92,51
1,135	19,42	1,315	41,39	1,495	59,70	1,675	75,49	1,827	92,77
1,140	20,08	1,320	41,95	1,500	60,17	1,680	75,92	1,828	93,03
1,145	20,73	1.325	42,51	1,505	60,62	1,685	76,34	1,829	93,33
1,150	21,38	1,330	43,07	1,510	61,08	1,690	76,77	1,830	93,64
1,155	22,03	1,335	43,62	1,515	61,54	1,695	77,20	1,831	93,94
1,160	22,63	1,340	44,22	1,520	61,54	1,700	77,20	1,832	94,24
1,165	23,31	1,345	44,72	1,525	62,45	1,705	78,06	1,833	94,72
1,170	23,95	1,350	45,26	1,530	62,91	1,710	78,49		
1,175	24,58	1,355	45,80	1,535	63,36	1,715	78,93		

Acidul clorhidric (HCl)

Acidum hydrochloricum

greutatea moleculară = 36,47 HCl

Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %
1,000	0,3600	1,045	9,510	1,085	17,45	1,125	25,22	1,165	33,16
1,005	1,360	1,050	10,52	1,090	18,43	1,130	26,20	1,170	34,18
1,010	2,364	1,055	11,52	1,095	19,41	1,135	27,18	1,175	35,20
1,015	3,374	1,060	12,51	1,100	20,39	1,140	28,18	1,180	36,23
1,020	4,388	1,065	13,50	1,105	21,36	1,145	29,17	1,185	37,27
1,025	5,408	1,070	14,495	1,110	22,33	1,150	30,14	1,190	38,32
1,030	6,433	1,075	15,485	1,115	23,29	1,155	31,14	1,195	39,37
1,035	7,464	1,080	16,47	1,120	24,25	1,160	32,14	1,198	40,00
1,040	8,490								

TABELUL 3 continuare)

Acidul nitric (HNO$_3$)

Acidum nitricum greutatea moleculară = 63,02 HNO

Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %
1,000	0,333	1,130	22,38	1,260	42,14	1,390	64,74	1,504	97,74
1,005	1,255	1,135	23,16	1,265	42,92	1,395	65,84	1,505	97,99
1,010	2,164	1,140	23,94	1,270	43,70	1,400	66,97	1,506	98,25
1,015	3,073	1,145	24,71	1,275	44,48	1,405	68,10	1,507	98,50
1,020	3,982	1,150	25,48	1,280	45,27	1,410	69,23	1,508	98,76
1,025	4,883	1,155	26,24	1,285	46,06	1,415	70,39	1,509	99,01
1,030	5,784	1,160	27,00	1,290	46,85	1,420	71,63	1,510	99,26
1,035	6,661	1,165	27,76	1,295	47,63	1,425	72,86	1,511	99,52
1,040	7,530	1,170	28,51	1,300	48,42	1,430	74,09	1,512	99,77
1,045	8,398	1,175	29,25	1,305	49,21	1,435	75,35	1,513	100,00
1,050	9,259	1,180	30,00	1,310	50,00	1,440	76,71		
1,055	10,12	1,185	30,74	1,315	50,85	1,445	78,07		
1,060	10,97	1,190	31,47	1,320	51,71	1,450	79,43		
1,065	11,81	1,195	32,21	1,325	52,56	1,455	80,88		
1,070	12,65	1,200	32,94	1,330	53,41	1,460	82,39		
1,075	13,48	1,205	33,68	1,335	54,27	1,465	83,91		
1,080	14,31	1,210	34,41	1,340	55,13	1,470	85,50		
1,085	15,13	1,215	35,16	1,345	56,04	1,475	87,29		
1,090	15,95	1,220	35,93	1,350	56,95	1,480	89,07		
1,095	16,76	1,225	36,70	1,355	57,87	1,485	91,13		
1,100	17,58	1,230	37,48	1,360	58,78	1,490	93,49		
1,105	18,39	1,235	38,25	1,365	59,69	1,495	95,46		
1,110	19,19	1,240	39,02	1,370	60,67	1,500	96,73		
1,115	20,00	1,245	39,80	1,375	61,69	1,501	96,98		
1,120	20,79	1,250	40,58	1,380	62,70	1,502	97,23		
1,125	21,59	1,255	41,36	1,385	63,72	1,503	97,49		

TABELUL 4

Densităţile soluţiilor de baze pentru t= 20°

Hidroxidul de sodiu (NaOH)

Liquor natri caustici greutatea moleculară = 40,01 NaOH

Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %
1,000	0,159	1,110	10,10	1,220	20,07	1,330	30,20	1,440	41,03
1,010	0,945	1,120	11,01	1,230	20,98	1,340	31,14	1,450	42,07
1,020	1,94	1,130	11,92	1,240	21,90	1,350	32,10	1,460	43,12
1,030	2,84	1,140	12,83	1,250	22,82	1,360	33,06	1,470	44,17
1,040	3,745	1,150	13,73	1,260	23,73	1,370	34,03	1,480	45,22
1,050	4,655	1,160	14,64	1,270	24,645	1,380	35,01	1,490	46,27
1,060	5,56	1,170	15,54	1,280	25,56	1,390	36,00	1,500	47,33
1,070	6,47	1,180	16,44	1,290	26,48	1,400	36,99	1,510	48,38
1,080	7,38	1,190	17,345	1,300	27,41	1,410	37,99	1,520	49,44
1,090	8,28	1,200	18,255	1,310	28,33	1,420	38,99	1,530	58,50
1,100	9,19	1,210	19,16	1,320	29,26	1,430	40,00		

TABELUL 4 (continuare)

Carbonatul de sodiu (Na_2CO_3)

Natrium carbonicum **greutatea moleculară = 106,0 Na_2CO_3**

Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %
1,000	0,19	1,040	4,03	1,080	7,85	1,120	11,60	1,160	15,20
1,005	0,67	1,045	4,50	1,085	8,33	1,125	12,05	1,165	15,60
1,010	1,14	1,050	4,98	1,090	8,80	1,130	12,52	1,170	16,03
1,015	1,62	1,055	5,47	1,095	9,27	1,135	13,00	1,175	16,45
1,020	2,10	1,060	5,95	1,100	9,75	1,140	13,45	1,180	16,87
1,025	2,57	1,065	6,43	1,105	10,22	1,145	13,90	1,185	17,30
1,030	3,05	1,070	6,90	1,110	10,68	1,150	14,35	1,190	17,70
1,035	3,54	1,075	7,38	1,115	11,14	1,155	14,75		

Amoniac (NH_3)

Liquor ammonii caustici **greutatea moleculară = 17,03 NH_3**

Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %
0,998	0,0465	0,974	5,75	0,950	12,03	0,926	10,06	0,902	26,67
0,996	0,512	0,972	6,25	0,948	12,58	0,924	19,67	0,900	27,33
0,994	0,977	0,970	6,75	0,946	13,14	0,922	20,27	0,898	28,00
0,992	1,43	0,968	7,26	0,944	13,71	0,920	20,88	0,896	28,67
0,990	1,89	0,966	7,77	0,942	14,29	0,918	21,50	0,894	29,33
0,988	2,35	0,964	8,29	0,940	14,88	0,916	22,125	0,892	30,00
0,986	2,82	0,962	8,82	0,938	15,47	0,914	22,75	0,890	30,685
0,984	3,30	0,960	9,34	0,936	16,06	0,912	23,39	0,888	31,37
0,982	3,78	0,958	9,87	0,934	16,65	0,910	24,03	0,886	32,09
0,980	4,27	0,956	10,405	0,932	17,24	0,908	24,68	0,884	32,84
0,978	4,76	0,954	10,95	0,930	17,85	0,906	25,33	0,882	33,595
0,976	5,25	0,952	11,49	0,928	18,45	0,904	26,00	0,880	34,35

Hidroxidul de potasiu (KOH)

Liquor kali caustici **greutatea moleculară = 56,11 KOH**

Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %	Densitatea	Greutatea %
1,000	0,197	1,110	12,08	1,220	23,38	1,330	33,97	1,440	43,92
1,010	1,295	1,120	13,14	1,230	24,37	1,340	34,90	1,450	44,79
1,020	2,38	1,130	14,19	1,240	25,36	1,350	35,82	1,460	45,66
1,030	3,48	1,140	15,22	1,250	26,34	1,360	36,735	1,470	46,53
1,040	4,58	1,150	16,26	1,260	27,32	1,370	37,65	1,480	47,39
1,050	5,66	1,160	17,29	1,270	28,29	1,380	38,56	1,490	48,25
1,060	6,74	1,170	18,32	1,280	29,25	1,390	39,46	1,500	49,10
1,070	7,82	1,180	19,35	1,290	30,21	1,400	40,37	1,510	49,95
1,080	8,89	1,190	20,37	1,300	31,15	1,410	41,26	1,520	50,80
1,090	9,96	1,200	21,38	1,310	32,09	1,420	42,155	1,530	51,64
1,100	11,03	1,210	22,38	1,320	33,03	1,430	43,04		

Dăm în tabelul 5 greutățile atomice ale elementelor din tabelul lui Mendeleev:

TABELUL 5

Tabelul principalelor elemente

	Simbolul	Greutatea atomică	Densitatea g/cm^3 20°/4°	Punctul de fuziune (°C)
1	2	3	4	5
Aluminiu	Al	26,98	2,7	658
Antimoniu	Sb	121,76	6,68	630
Argint	Ag	107,88	10,5	960
Arsenic	As	74,91	5,72	615 subl.
Azot	N	14,008	1,25	−210,5
Bariu	Ba	137,36	3,5	710
Bismut	Bi	209,00	9,8	271
Bor (crist.)	B	10,82	3,33	2 300
Brom	Br	79,916	3,14	−7,3
Cadmiu	Cd	112,41	8,64	321
Calciu	Ca	40,08	1,55	850
Carbon (grafit)	C	12,01	2,25	3 652 subl.
Clor	Cl	35,457	1,507	−100,5
Crom	Cr	52,01	6.92	1 920
Cobalt	Co	58,94	8,9	1 492
Cupru	Cu	63,54	8,92	1 084
Staniu	Sn	118,70	7,2	231,8
Fier	Fe	55,85	7,86	1 535
Fluor	F	19,00	1,695	−218
Galiu	Ga	69,72	5,9	29,5
Hidrogen	H	1,0080	0,09	−262
Iod	I	126,91	4.93	113,6
Litiu	Li	6,94	0,534	179
Magneziu	Mg	24,32	1,74	657
Manganez	Mn	54,94	7,2	1 221
Mercur	Hg	200,61	13,55	− 38,8
Molibden	Mo	95,95	10,2	2 622
Nichel	Ni	58,71	8,9	1 453
Aur	Au	197,0	19,25	1 063
Oxigen	O	16	1,429	−218,7
Paladiu	Pd	106,7	11.97	1 555
Fosfor (alb)	P	30,975	1,82	44,1
Platină	Pt	195,09	21,45	1 773
Plumb	Pb	207,21	11,34	327
Potasiu	K	39,1	0,86	63,5
Seleniu	Se	78,96	4,26	220
Siliciu (crist.)	Si	28,09	2,4	1 414
Sodiu	Na	22,99	0,97	97,7
Sulf (rhomb.)	S	32,06	2,07	112,8
Stronțiu	Sr	87,63	2,16	757
Teluriu	Te	127,6	6,24	452
Taliu	Tl	204,39	11,84	303
Titaniu	Ti	47,90	4,4	1 800
Tungsten	Tu sau V	183,86	19,3	3 380
Uraniu	U	238,07	19,0	1 689
Vanadiu	V	50,95	6,07	1 726
Zinc	Zn	65,38	7,01	419,4

Dăm în tabelul 7 greutățile echivalente ale unor substanțe, utilizate mai curent în laborator.

TABELUL 6

Tabelul periodic al elementelor

	Ia	IIa	IIIb	IVb	Vb	VIb	VIIb		VIII		Ib	IIb	IIIa	IVa	Va	VIa	VIIa	0	
1	1 H 1,0080																	2 He 4,003	
2	3 Li 6,940	4 Be 9,013											5 B 10,82	6 C 12,010	7 N 14,008	8 O 16,000	9 Fe 19,00	10 Ne 20,183	
3	11 Na 22,997	12 Mg 23,32											13 Al 26,98	14 Si 28,09	15 P 30,975	16 S 32,066	17 Cl 35,457	18 Ar 39,944	
4	19 K 39,100	20 Ca 40,08	21 Sc 44,96	22 Ti 47,90	23 V 50,95	24 Cr 52,01	25 Mn 54,94	26 Fe 55,85	27 Co 58,71	28 Ni 58,71	29 Cu 63,54	30 Zn 65,38	31 Ca 69,72	32 Ge 72,60	33 As 74,91	34 Se 78,96	35 Br 79,916	36 Kr 83,80	
5	37 Rb 85,48	38 Sr 87,63	39 Y 88,92	40 Zr 91,22	41 Nb 92,91	42 Mo 95,95	43 Tc 99	44 Ru 101,7	45 Rh 102,91	46 Pd 106,7	47 Ag 107,88	48 Cd 112,41	49 In 114,76	50 Sn 118,70	51 Sb 121,76	52 Te 127,61	53 I 126,91	54 Xe 131,3	
6	55 Cs 132,91	56 Ba 137,36	57—71 a vedea pămînt rar	72 Hf 178,6	73 Ta 180,88	74 W 183,86	75 Re 186,31	76 Os 190,2	77 Ir 193,1	78 Pt 195,09	79 Au 197,0	80 Hg 200,61	81 Ti 204,39	82 Pb 207,21	83 Bi 209,00	84 Po 210±	85 At 210±	86 Rn 222	
7	87 Fr 223±	88 Ra 226,05	89—102 a vedea Actinide																
			pămînt rar		57 La 138.92	58 Ce 40,13	59 Pr 140,92	60 Nd 144,27	61 Pm 147 ±	62 Sm 150,43	63 Eu 152,0	64 Gd 156,9	65 Tb 159,2	66 Dy 162,46	67 Ho 164,94	68 Er 167,2	69 Tm 169,4	70 Yb 173,04	71 Cp(Lu) 174,99
			Actinide		89 Ac 227 ±	190 Th 232,12	91 Pa 231	92 U 238,07	93 Np 237	94 Pu 242	95 Am 243	96 Cm 245	97 Bk 249	98 Cf 249	99 Es 253±	100Fm 255±	101 Md 256±	102 No 253 ±	

TABELUL 7

Greutățile echivalente ale unor substanțe utilizate în laborator

Substanțele	Greutatea moleculară	Greutatea echivalentă	Numărul echivalenților
1	2	3	4
HCl	36,47	36,47	1
HNO_3	63,02	63,02	1
H_2SO_4	98,08	49,04	2
H_3PO_4	98,00	49,00	2
H_3PO_4	98,00	98,00	1
$HC_2H_3O_2$	60,05	60,05	1
$H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$	126,07	63,04	2
$H_2C_4H_4O_4$	118,08	59,04	2
$Ba(OH)_2$	171,38	85,69	2
$Ca(OH)_2$	74,10	37,05	2
KOH	56,10	56,10	1
NH_4OH	35,05	35,05	1
$NaHCO_3$	84,02	84,02	1
$NaOH$	40,01	40,01	1
$Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$	381,43	190,72	2
$K_2Cr_2O_7$	294,2	49,03	6
$K_2S_2O_8$	270,34	135,17	2
$(NH_4)_2S_2O_8$	228,22	114,11	2
$KMnO_4$ (în mediu acid)	158,03	31,6	5
$NaClO$	74,46	37,23	2
$KBrO$	135,02	67,51	2
HIO_3	175,93	29,32	6
H_2O_2	34,02	17,01	2
$Ca(OCl)$	143,0	35,75	4
$FeCl_3$	162,22	162,22	1
H_2S	34,08	17,04	2
As_2O_3	197,92	49,48	4
$Na_2S_2O_3 . 5H_2O$	248,21	278,21	1
$FeSO_4 . 7H_2O$	278,02	278,02	1
$SnCl_2$	189,62	94,81	2
$H_2C_2O_4$	90,02	45,01	2
Ag	107,88	107,88	1
$AgNO_3$	169,89	169,89	1
KBr	119,01	119,01	1
$KCNS$	97,18	97,18	1
KCl	74,55	74,55	1
KI	166.02	166,02	1
NH_4Cl	53,50	53,50	1
MnO_2	86,93	43,47	2
K_2CrO_4	194,2	64,73	3
Cl_2	70,92	35,46	2
Br_2	150,84	79,92	2
I_2	253,84	126,92	2
NH_4CNS	76,12	76,12	1
$NaBr$	102,91	102,91	1
$NaCl$	58,45	58,45	1
NaI	149,92	149,92	1
HCN	27,03	27,03	1

Prepararea alcoolului de diferite grade se poate efectua conform tabelului 8.

Se cere să se prepare alcool 60% plecînd de la unul de 95%. Pentru aceasta căutăm pe co-

TABELUL 8

	100	99	98	97	96	95	94	93	92		90	85	80	75	70	65	60	55	50
95	6,50	5.15	3,83	2,53	1,25														
90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41	5,10	3,80	2,54										
85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	1,96	10,59	9,24	85	6,56								
80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	19,49	18,04	16,61	80	13,79	6,83							
75	37,58	35,90	34,28	32,67	61,08	29,52	27,97	26,43	24,94	75	21,89	14,48	7,20						
70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	37,53	35,89	34,27	70	31,10	23,14	15,35	7,64					
65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	48,45	46,70	44,96	65	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15				
60	72,82	70,80	68,80	66,85	64,92	63	61,10	59,21	57,33	60	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76			
55	88,60	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	75,93	73,88	71,85	55	67,87	57,90	48,07	38,32	28,63	19,02	9.47		
50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	93,64	91,41	89,19	50	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	10,35	
45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	115,09	112,64	110,18	45	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46.09	34,46	22,90	11.41
40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	141,70	138,95	146,23	40	130,80	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	38,46	25,55
35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	175,60	172,49	169,39	35	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	70,08	58,31	43,59
30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	220,49	216,90	213,33	30	206,22	188,57	171,05	153,53	136,34	118,94	101,71	84,54	67,45
25	308,90	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	283,02	278,77	274,53	25	266,12	245,15	224,30	203,61	182,83	162,21	141,65	121,16	100,73
20	408,50	403,13	397,79	392,47	387,17	381,90	376,64	371,40	366,16	20	355,80	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	175,96	150,55
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	532,74	525,83	518,94	15	505,27	471,00	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	267,29	233,64
10	907,09	896,73	886,40	876,10	865,15	855,55	845,31	835,08	824,86	10	804,50	753,65	702,89	652,21	601,60	551,06	500,50	450,19	399 85

loana orizontală cifra 95, iar pe cea verticală 60. La intersecția celor două linii cu originile în punctele 95 și 60 găsim cifra 63. Deci, dacă amestecăm 100 cm^3 alcool 95% cu 63 cm^3 apă obținem alcool de 60%.

Dăm în tabelul 9 principalii indicatori întrebuințați în reacțiile de neutralizare.

Uneori, cînd reacția de culoare a indicatorului nu este prea ușor de urmărit, se pot utiliza amestecuri de indicatori — conform tabelului 10.

TABELUL 9

Indicatorii obișnuiți din laborator

Indicatori Sörensen

Numele indicatorului	Denumirea chimică	Domeniul de viraj	Variația de culoare	Concentrația soluției de indicator
Metiloranj	Dimetil-amino-azobenzol sulfonat de sodiu	3,1—4,4	Roșie-galbenă-portocalie	Soluție apoasă 0,1 %
Roșu de Congo	Acid benzidin-diazo-m-amido-benzol-sulfo-1-naftilamin-4-sulfonic	3,0—5,2	Albastră-violetă-roșie	Soluție apoasă 0,1 %
Roșu de metil	Acid dimetil-amino-azobenzol-o-carbonic	4,4—6,2	Roșie-galbenă	Soluție 0,2 % în alcool 70 %
Roșu neutral	Clorură de dimetil-diamino-fenazină	6,8—8,0	Roșie-galbenă	Soluție 0,1 % în alcool 70 %
Lacmus (turnesol)	—	5,0—8,0	Roșie-albastră	Soluție apoasă 1 %
α-naftolftaleină	—	7,3—8,7	Roză-gălbuie-albastră	Soluție alcoolică 0,1 %
Crezolftaleină	o-Crezolftaleină	8,2—9,8	Incoloră-roșie	Soluție alcoolică 0,1 %
Fenolftaleină	—	8,2—10,0	Incoloră-roșie	Soluție alcoolică 0,1 %
Timolftaleină	—	9,3—10,5	Incoloră-albastră	Soluție alcoolică 0,1 %
Galben de alizarină R	p-Nitranil-inazosalicilat de sodiu	10,0—12,1	Galbenă-violetă	Soluție alcoolică 0,1 %

Indicatori Clark și Lubs

Numele indicatorului	Denumirea chimică	Domeniul de viraj	Variația de culoare	Cantitatea NaOHN/20 ml	Concentrația de coloranți g% în soluția alcoolică 96°
Albastru de timol	Timolsulfoftaleină	1,2—2,8	Roșie-galbenă		
Albastru de bromfenol	Tetrabromofenol sulfoftaleină	3,0—4,6	Galbenă-albastră-violetă	3,0	0,04
Verde (albastru) de bromcrezol	Tetrabrom-m-crezol-sulfoftaleină	3,8—5,4	Galbenă-albastră	2,9	0,04
Roșu de clorfenol	Diclor-fenolsulfoftaleină	4,8—6,4	Galbenă-roșie	4,7	0,04
Roșu de bromfenol	Dibrom-fenol-sulfoftaleină	5,2—6,8	Galbenă-roșie	3,9	0,04
Purpură de brom-crezol	Dibrom-crezol-sulfoftaleină	5,2—6,8	Galbenă-purpurie	3,7	0,02
Albastru de bromtimol	Dibrom-timol-sulfoftaleină	6,0—7,6	Galbenă-albastră	3,2	0,04
Roșu de fenol	Fenolsulfoftaleină	6,8—8,4	Galbenă-roșie	5,6	0,02
Roșu de crezol	Crezolsulfo-o-ftaleină	7,2—8,8	Galbenă-roșie	5,3	0,02
Albastru de timol	Timol-sulfoftaleină	8,0—9,6	Galbenă-albastră	4,3	0,04

Notă: coloranții sînt dizolvați, fie în alcool 96° în concentrația din tabel fie că se triturează 0,1 g colorant în cantitatea de NaOH N/20 din tabel și apoi se dizolvă în 250 ml apă distilată.

TABELUL 10

Amestecuri de indicatori

Compoziția soluției indicatorului	pH de folosit	Schimbarea culorii		Observații
		de la	la	
1	2	3	4	5
O parte galben dimetil (0,1 % în alcool) la o parte albastru de metilen (0,1 % în alcool)	2,25	Albastră-violetă	Verde	Pînă la pH 3,2 este albastru-violet; peste pH 3,4 este verde
O parte metiloranj (0,1 % în apă) la o parte indigo-carmin (0,25 % în apă)	4,1	Violetă	Verde	Indicator foarte potrivit pentru titrare la lumina artificială
Trei părți albastru brom-crezol (0,1 % în alcool) la o parte roșu-metil (0,1 % în alcool)	5,1	Roșie	Verde	Peste pH 5,1 schimbarea este bruscă a culorii din roșu în verde
O parte verde-bromcrezol (0,1 % în apă) la o parte alizarin-sulfonat de sodiu (0,1 % în apă)	5,6	Violetă	Galbenă-verzuie	La pH 5,6 este roșu-violet
O parte roșu-neutral (0,1 % în alcool) la o parte albastru de metilen (0,1 % în apă)	7,0	Violetă-albastră	Verde	La pH 7 este albastru-violet. Se păstrează în sticle brune
O parte albastru brom-timol (0,1 % în apă) la o parte roșu de fenol (0,1 % în apă)	7,5	Galbenă	Violetă	La pH 7,2 este verde murdar; la pH 7,4 este slab violet; la pH 7,6 este violet închis
O parte roșu-crezol (0,1 % în apă) la trei părți albastru-timol (0,1 % în apă)	8,3	Galbenă	Violetă	La pH 8,2 este galben ; la pH 8,4 este violet clar
O parte albastru-timol (0,1 % în apă) la trei părți fenolftaleină (0,1 % în alcool 50 %)	9,0	Galbenă	Violetă	La pH 9,0 este galben-violet
Două părți fenolftaleină (0,1 % în alcool 50 %) la o parte o-naftolftaleină (0,1 % în alcool 50 %)	9,6	Slab-roză	Violetă	La pH 9,6 este verde
O parte fenolftaleină (0,1 % în alcool) la o parte timolftaleină (0,1 % în alcool)	9,9	Incoloră	Violetă	La pH 9,6 este roz-pal; la pH 10,0 este violet
Două părți timolftaleină (0,1 % în alcool) la o parte galben de alizarină (0,1 % în alcool)	10,2	Galbenă	Violetă	Viraj net
Două părți albastru de Nil (0,2 % în alcool) la o parte galben de alizarină (0,1 % în alcool)	10,8	Verde	Roșie-brună	

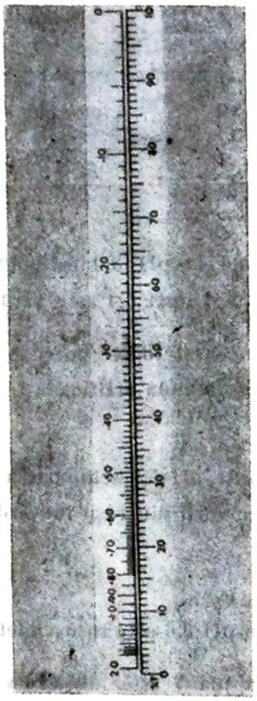


Fig. 1. — Nomogramă pentru convertirea T% — D.O.

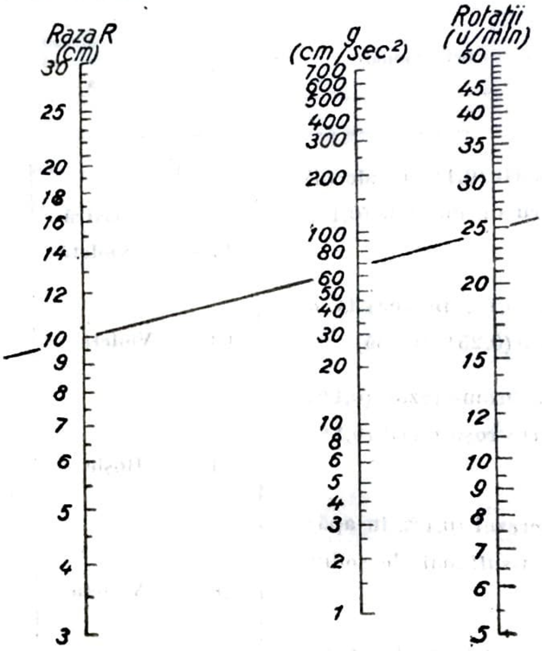

Raza R (cm)
30
25
20
18
16
14
12
10
9
8
7
6
5
4
3
g (cm/sec²)
700
600
500
400
300
200
100
80
60
50
40
30
20
10
8
6
5
4
3
2
1
Rotaţii (u/min)
50
45
40
35
30
25
20
15
12
10
9
8
7
6
5

Fig. 2. — Nomogramă pentru convertirea rotaţiilor (u/min.) în g-uri.

TABELUL 11

Echivalenţa T% — D.O.

%T	Densitatea optică				%T	Densitatea optică			
		1 (.25)	2 (.50)	3 (.75)			1 (.25)	2 (.50)	3 (.75)
1	2.000	1.903	1.824	1.757	24	.620	.615	.611	.606
2	1.699	1.648	1.602	1.561	25	.602	.598	.594	.589
3	1.523	1.488	1.456	1.426	26	.585	.581	.577	.573
4	1.398	1.372	1.347	1.323	27	.569	.565	.561	.557
5	1.301	1.280	1.260	1.240	28	.553	.549	.545	.542
6	1.222	1.204	1.187	1.171	29	.538	.534	.530	.527
7	1.155	1.140	1.126	1.112	30	.523	.520	.516	.512
8	1.097	1.083	1.071	1.059	31	.509	.505	.502	.498
9	1.046	1.034	1.022	1.011	32	.495	.491	.488	.485
10	1.000	.989	.979	.969	33	.482	.478	.475	.472
11	.959	.949	.939	.930	34	.469	.465	.462	.459
12	.921	.912	.903	.894	35	.456	.453	.450	.447
13	.886	.878	.870	.862	36	.444	.441	.438	.435
14	.854	.846	.838	.831	37	.432	.429	.426	.423
15	.824	.817	.810	.803	38	.420	.417	.414	.412
16	.796	.789	.782	.776	39	.409	.406	.403	.401
17	.770	.763	.757	.751	40	.398	.395	.392	.390
18	.745	.739	.733	.727	41	.387	.385	.382	.380
19	.721	.716	.710	.704	42	.377	.374	.372	.369
20	.699	.694	.688	.683	43	.367	.364	.362	.359
21	.678	.673	.668	.663	44	.357	.354	.352	.349
22	.658	.653	.648	.643	45	.347	.344	.342	.340
23	.638	.634	.629	.624	46	.337	.335	.332	.330

TABELUL II (continuare)

%T	Densitatea optică				%T	Densitatea optică			
47	.328	.325	.323	.321	74	.1 308	.1 293	.1 278	.1 264
48	.319	.317	.314	.312	75	.1 249	.1 235	.1 221	.1 206
49	.310	.308	.305	.303	76	.1 192	.1 177	.1 163	.1 149
50	.301	.299	.297	.295	77	.1 135	.1 121	.1 107	.1 093
51	.2 924	.2 903	.2 882	.2 861	78	.1 079	.1 065	.1 051	.1 037
52	.2 840	.2 819	.2 798	.2 777	79	.1 024	.1 010	.0 996	.0 982
53	.2 756	.2 736	.2 716	.2 696	80	.0 969	.0 955	.0 942	.0 928
54	.2 676	.2 656	.2 636	.2 616	81	.0 915	.0 901	.0 888	.0 875
55	.2 596	.2 577	.2 557	.2 537	82	.0 862	.0 848	.0 835	.0 822
56	.2 518	.2 499	.2 480	.2 460	83	.0 809	.0 796	.0 783	.0 770
57	.2 441	.2 422	.2 403	.2 384	84	.0 757	.0 744	.0 731	.0 718
58	.2 366	.2 347	.2 328	.2 310	85	.0 706	.0 693	.0 680	.0 667
59	.2 291	.2 273	.2 255	.2 236	86	.0 655	.0 642	.0 630	.0 617
60	.2 218	.2 200	.2 182	.2 164	87	.0 605	.0 593	.0 580	.0 568
61	.2 147	.2 129	.2 111	.2 093	88	.0 555	.0 543	.0 531	.0 518
62	.2 076	.2 059	.2 041	.2 024	89	.0 505	.0 494	.0 482	.0 470
63	.2 007	.1 990	.1 973	.1 956	90	.0 458	.0 446	.0 434	.0 422
64	.1 939	.1 922	.1 905	.1 888	91	.0 410	.0 398	.0 386	.0 374
65	.1 871	.1 855	.1 838	.1 821	92	.0 362	.0 361	.0 339	.0 327
66	.1 805	.1 788	.1 772	.1 756	93	.0 315	.0 304	.0 292	.0 281
67	.1 739	.1 723	.1 707	.1 691	94	.0 269	.0 257	.0 246	.0 235
68	.1 675	.1 659	.1 643	.1 627	95	.0 223	.0 212	.0 200	.0 188
69	.1 612	.1 596	.1 580	.1 565	96	.0 177	.0 166	.0 155	.0 144
70	.1 549	.1 534	.1 518	.1 503	97	.0 132	.0 121	.0 110	.0 099
71	.1 487	.1 472	.1 457	.1 442	98	.0 088	.0 077	.0 066	.0 055
72	.1 427	.1 412	.1 397	.1 382	99	.0 044	.0 033	.0 022	.0 011
73	.1 367	.1 352	.1 337	.1 322	100	.0 000	.0 000	.0 000	.0 000

Prepararea indicatorilor standard după Michaelis

Seria I

Nr. tub	PH	Soluție α-dinitrofenol	Soluție CO_3Na_2 N/10
1	2,8	0,51	6,49
2	3,0	0,78	6,22
3	3,2	1,20	5,80
4	3,4	1,74	5,20
5	3,6	2,50	4,50
6	3,8	3,40	3,60
7	4,0	4,60	3,40
8	4,2	5,70	1,30
9	4,4	6,70	0,30

Seria a II-a

Nr. tub	pH	Soluție γ-dinitrofenol	Soluție CO_3Na_2 N/10
1	4,0	0,71	6,29
2	4,2	1,10	5,90
3	4,4	1,65	5,35
4	4,6	2,40	4,60
5	4,8	3,40	3,60
6	5,0	4,50	2,50
7	5,2	5,50	1,50
8	5,4	6,60	0,40

Seria a III-a

Nr. tub	PH	Soluție p-dinitrofenol	Soluție CO_3Na_2 N/10
1	5,4	0,16	6,84
2	5,6	0,25	6,75
3	5,8	0,40	6,60
4	6,0	0,63	6,37
5	6,2	0,94	6,06
6	6,4	1,40	5,60
7	6,6	2,08	4,92
8	6,8	3,00	4,00
9	7,0	4,05	2,95

Seria a IV-a

Nr. tub	pH	Soluție m-dinitrofenol	Soluție CO_3Na_2 N/10
1	6,8	0,27	6,73
2	7,0	0,43	6,57
3	7,2	0,66	6,34
4	7,4	1,00	6,00
5	7,6	1,50	5,50
6	7,8	2,30	4,70
7	8,0	3,00	4,00
8	8,2	4,20	2,00
9	8,4	5,20	1,80

METODE FIZICO—CHIMICE DE ANALIZĂ

METODE OPTICE

REFRACTOMETRIA

La baza refractometriei stă capacitatea pe care o au diferite medii, de a refracta în mod diferit razele de lumină care le străbat. Cînd o rază de lumină trece dintr-un mediu de o anumită densitate într-altul de densitate diferită, ea îşi schimbă direcţia sau se „refractă".

Se numeşte *indice de refracţie* (notat cu n) raportul între sinusul unghiului de incidenţă al razei (α), faţă de verticală, şi sinusul unghiului de refracţie (β)

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$$

Indicele de refracţie este o constantă fizică caracteristică pentru o substanţă dată, depinzînd de cantitatea, mărimea şi structura fizică a particulelor dizolvate.

Determinarea lui se face cu ajutorul refractometrelor. Cel mai utilizat tip de refractometru este refractometrul Abbé (vezi figura 3). Raza de lumină, venită prin oglindă (1), ajunge la prismă (2). Ea este formată din 2 jumătăţi, între care se găseşte substanţa de analizat, întinsă într-un strat uniform.

Prin rotirea prismei se obţine reflexia interioară totală a luminii de suprafaţa stratului substanţei analizate.

Acest moment este indicat în ocularul aparatului (3) prin separarea netă a 2 cîmpuri, unul luminat, altul complet întunecat, ceea ce reprezintă o dispersie a luminii în substanţa cercetată şi în prisme — egală şi de sens contrar. Cînd linia de separare a celor 2 cîmpuri apare perfect delimitată şi la mijlocul ocularului, se citeşte gradaţia respectivă pe scala aparatului (4) (fig. 3).

Înaintea determinărilor refractometrice trebuie verificat aparatul, determinînd indicele de refracţie a apei distilate, care la 20° trebuie să fie = 1,333 00.

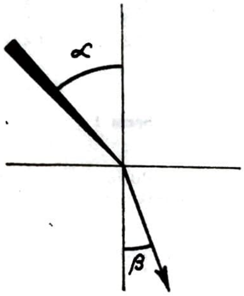


Fig. 3. — Indice de refracţie (explicaţii în text).

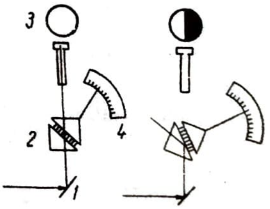


Fig. 4. — Schema refractometrului tip Abbé (explicaţii în text).

Deoarece indicele de refracţie variază foarte mult cu temperatura, se face corecţia după tabelul 12.

TABELUL 12

Corecţia de temperatură pentru indicele de refracţie a apei distilate

Grade Celsius	*n*	Grade Celsius	*n*
10°	1,333 7	21°	1,332 91
11°	1,333 64	22°	1,332 82
12°	1,333 58	23°	1,332 72
13°	1,333 52	24°	1,332 62
14°	1,333 46	25°	1,332 52
15°	1,333 39	26°	1,332 42
16°	1,333 31	27°	1,332 31
17°	1,333 24	28°	1,332 20
18°	1,333 16	29°	1,332 08
19°	1,333 08	30°	1,331 96
20°	1,333 00		

La etalonarea refractometrelor se utilizează uneori lichide standard, al căror indice de refracţie pentru n^{20} este bine determinat.

Dăm în tabelul 13 indicii de refracţie ai unor lichide de etalonare.

TABELUL 13

Indicii de refracţie ai unor lichide de etalonare

Lichidul	n^{20}	Lichidul	n^{20}
2,2,4-Trimetil-pentan	1,381 45	Ciclohexanol	1,467 8
Metil-ciclohexan	1,423 12	Clorbenzen	1,525 0
Toluen	1,496 93	o-nitro-toluen	1,546 6
Apă	1,333 0	Bromoform	1,597 3
Benzen	1,501 7	Chinoleină	1,627 2
Acetonă	1,359 2	1-brom-naftalină	1,658 0

Cînd se fac determinări refractometrice se întrebuinţează întotdeauna băi Hoepler, care să menţină constantă temperatura substanţei de analizat.

Principala aplicaţie a refractometriei în laboratorul clinic este bazată pe observaţia lui Reiss, după care indicele de refracţie al serului depinde de concentraţia sa în proteine.

Pentru aceasta, întinzînd o picătură de ser între prismele aparatului şi determinînd pe *n*, găsim direct şi rapid concentraţia proteinelor serice. Metoda este aplicabilă şi pentru exsudate sau transsudate.

Dăm mai jos tabelul lui Reiss (tabelul nr. 14) indicînd concentraţia proteinelor din ser, transsudate şi exsudate, în funcţie de *n* (indicele de refracţie), pentru temperatura de 17°,5.

De remarcat că determinarea proteinelor după această metodă este susceptibilă de numeroase critici, valorile obţinute prezentînd un anumit grad de aproximaţie. Serurile opalescente, în special, pot da erori apreciabile. Datorită rapidităţii şi comodităţii sale, metoda este larg răspîndită şi serveşte în clinică pentru orientare. Cînd se cer însă valori mai precise, se indică utilizarea metodelor chimice.

TABELUL 14

Concentraţia proteinelor în funcţie de indicele de refracţie, pentru t = 17⁰, 5

$n_{17^\circ,5}$	Concentraţia proteinelor serice ($g^0/_{00}$)	Concentraţia proteinelor din exsudate sau transsudate ($g^0/_{00}$)	$n_{17^\circ,5}$	Concentraţia proteinelor serice ($g^0/_{00}$)	Concentraţia proteinelor din exsudate sau transsudate ($g^0/_{00}$)
1,337 05	6,3	7,7	1,345 75	56,8	55
1,337 43	8,6	9,7	1,346 12	59	57
1,337 81	10,8	11,8	1,346 50	61,2	59
1,338 20	13	13	1,346 87	63,4	61,1
1,338 58	15,2	15,9	1,347 24	65,5	63,1
1,338 96	17,4	17	1,347 61	67,7	65,1
1,339 34	19,6	20,1	1,347 98	69,8	67,1
1,339 72	21,8	22,1	1,348 36	72	69,1
1,340 10	24	24,2	1,348 73	74,2	71,2
1,340 48	26,2	26,2	1,349 10	76,9	73,2
1,340 86	28,4	28,3	1,349 47	78,5	75,2
1,341 24	30,6	30,4	1,349 84	80,6	77,2
1,341 62	32,8	32,4	1,350 21	82,8	79,2
1,341 99	35	34,5	1,350 58	84,9	81,2
1,342 37	37,2	36,5	1,350 95	87,1	83,2
1,342 75	39,4	38,6	1,351 32	89,2	85,2
1,343 13	41,6	40,7	1,351 69	91,4	87,2
1,343 50	43,8	42,7	1,352 05	93,5	89,2
1,343 88	46	44,8	1,352 42	95,7	91,2
1,344 26	48,1	46,8	1,352 79	97,8	93,2
1,344 63	50,3	48,9	1,353 16	99,9	95,2
1,345 00	52,5	51	1,353 52	102	97,2
1,345 37	54,7	53	1,353 88	104,1	99,1

POLARIMETRIA

Se înţelege sub numele de polarimetrie măsurarea deviaţiei luminii polarizate, produsă de substanţele optic active. Lumina polarizată este constituită din vibraţii transversale, cu direcţie fixă, planul vibrării fiind reprezentat prin axa de propagare. Ea se obţine trecînd lumina naturală prin prisme speciale — numite nicoli — care au proprietăţi birefringente.

Substanţele optic active sînt caracterizate prin disimetria moleculară, prezentînd în structura lor un carbon asimetric (carbon care are toate 4 valenţele satisfăcute de radicali diferiţi). Rotaţia luminii polarizate se poate face spre dreapta, în care caz unghiul respectiv se înseamnă cu (+) sau spre stînga, în care caz se înseamnă cu (—).

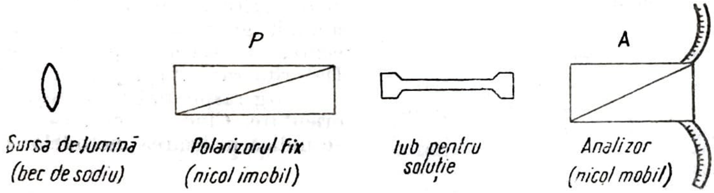


Fig. 5. — Schema polarimetrului.

Biot a arătat că, pentru o anumită lungime de undă, unghiul de rotaţie α este proporţional cu grosimea soluţiei traversată (l) şi concentraţia ei (c). Constanta de proporţionalitate, specifică fiecărei substanţe, a luat numele de „unghi de rotaţie specifică" şi se notează cu $[\alpha]_D^{20}$, indicîndu-se temperatura şi lumina cu care se lucrează (linia D a sodiului)

$$\lambda = 589{,}5\ \text{m}\mu$$

Relaţia Biot se scrie deci:

$$\alpha = [\alpha]_D^{20}\, l\, c$$

De aici obţinem formula pentru calcularea concentraţiei unei substanţe optic active, într-o soluţie:

$$c = \frac{\alpha \cdot 100}{[\alpha]_D^{20} \times l} = \text{g substanţă la 100 ml soluţie,}$$

în care:

α = unghiul citit la aparat;
l = lungimea tubului utilizat;
$[\alpha]_D^{20}$ = unghiul de rotaţie specific al substanţei.

În practică, pentru determinarea unghiurilor de rotaţie α se utilizează *polarimetrele*. Ele sînt aparate care permit măsurarea unghiului cu care este deviat planul luminii polarizate, prin intercalarea unei soluţii de substanţă optic activă. Polarimetrul este constituit dintr-un polarizor fix, un tub pentru soluţia de cercetat şi un analizor al cărui unghi de rotaţie poate fi citit precis pe o scară gradată.

Printr-un sistem optic suplimentar, ocularul polarimetrului apare împărţit, fie în două jumătăţi, fie în trei fîşii. Acestea sînt egal luminate; dacă polarizorul şi analizorul sînt în aceeaşi poziţie, gradaţia scalei trebuie să fie în acest caz la zero. Poziţia respectivă se fixează fără lichid în tub.

Dacă se interpune o soluţie optic activă, jumătate din cîmpul ocularului (sau fîşia centrală faţă de cele laterale) îşi schimbă luminozitatea. Rotind analizorul, se revine la egalitatea de lumină şi se citeşte unghiul α pe gradaţia scării. În laboratorul clinic, unde dozarea glucozei este cea mai curentă determinare polarimetrică, se utilizează tuburi de 189,4 mm, la care citirea în grade arată direct procentul de glucoză sau de 94,7 mm, la care citirea se înmulţeşte cu 2.

Pe acest principiu se construiesc polarimetre, gradate direct în concentraţii de glucoză.

Dăm în tabelul 15 $[\alpha]_D^{20}$ a principalelor glucide unor compuşi de importanţă biologică.

TABELUL 15

Unghiul de rotaţie specific al principalelor glucide

Glucid	$[\alpha]_D^{20}$	Glucid	$[\alpha]_D^{20}$
Glucoză	+ 52,74	Lactoză	+ 55,30
Fructoză	— 93,78	Manoză	+ 14,5
Galactoză	+ 80,70	Arabinoză	+105
Maltoză	+136,90	Xiloză	+ 19
Zaharoză	+ 66,50	Celobioză	+ 35

COLORIMETRIA

Metodele colorimetrice de analiză se bazează pe legea lui Bouguer-Beer: culoarea unei soluţii este în funcţie de concentraţia sa în

TABELUL 16

Unghiul de rotație specific al unor compuși biologici

Numele	$[\alpha]_D^{20}$	Numele	$[\alpha]_D^{20}$
L (+) alanină	+ 2°,7 (în apă)	Acid colic	+ 37°
L (–) serină	– 6°,8 —	Coprosterol	+ 28° (în cloroform)
Acid L (+) aspartic	+ 4°,7 —	Corticosteron	+178° (în etanol)
Acid L (+) glutamic	+16°,3 —	Cortizon	+209°
L (+) arginină	+12°,5 —	Ergosterol	–105°,5 (în eter)
L (–) prolină	–84°,9 —	Estradiol	+ 81° (în alcool)
L (–) histidină	–39°,65 —	Estron	+165° (în cloroform)
Colesterol	–39°,5 (în cloroform)	Progesteron	+191°,5 (în alcool)
		Testosteron	+109°
		n (+) glucoză	+ 52°,5 (la echilibru)

substanță colorată, precum și de grosimea stratului colorat.

Legea lui Bouguer-Beer se exprimă astfel:

$$c = b \times l \times D.O.,$$

în care:

c = concentrația în colorant;

b = o constantă (factorul de proporționalitate);

l = lungimea (grosimea) stratului de lichid;

$D.O.$ = densitatea optică (extincția sau absorbția).

Instrumentele care se bazează pe această relație sau derivate ale ei se pot împărți convențional în: colorimetre vizuale (sau optice) în care diferențele de intensitate ale culorilor de cercetat sînt apreciate cu ochiul liber și electrocolorimetre în care aceste diferențe sînt înregistrate de o celulă fotoelectrică racordată cu un galvanometru. Tranziția între aceste tipuri de aparate este făcută de fotometrele cu scară, dintre care cea mai largă răspîndire a căpătat-o instrumentul construit de Pulfrich.

Mai jos sînt date schemele principiale de construcție și modul de lucru cu colorimetrele mai răspîndite la noi.

COLORIMETRIA VIZUALĂ

În colorimetria vizuală (relativă), cele mai utilizate aparate sînt comparatorul și colorimetrul.

Comparatorul este format dintr-un stativ de lemn prevăzut cu 4–6 orificii și o serie de tuburi cu soluții standard, avînd fiecare intensități și concentrații diferite. Cu această serie de eprubete standard se compară lichidul de cercetat.

Colorimetrul. La noi este cunoscut colorimetrul lui Duboscq.

Principiul de funcționare derivă din legea lui Bouguer-Beer, în care concentrația de substanță colorată este în funcție de lungimea stratului de soluție prin variația distanței dintre ochiul observator și fundul cuvei cu lichid.

Ecuația colorimetrelor de acest tip se deduce din relația:

$$\frac{C_x}{C_s} = \frac{l_s}{l_x}$$

unde: C_x și C_s = concentrația probei necunoscute, respectiv a probei standard;

l_s și l_x = lungimea de strat sub care culoarea probei necunoscute apare egală cu a probei standard.

Prin urmare:

$$C_x = \frac{l_s}{l_x} C_s$$

Colorimetrul Duboscq este constituit din 3 părți principale: sursa de lumină, sistemul optic și suporții aparatului. Sursa de lumină este un bec electric, cu filament special.

Sistemul optic este compus din două prisme P_1P_2 și un ocular (oc). Sistemul de prisme împarte cîmpul ocularului în două jumătăți despărțite printr-un fir de demarcație constituit din muchiile prismelor. Sistemul de prisme dirijează fasciculele luminoase, în așa fel încît fasciculul de raze care trece prin cilindrul drept al aparatului se proiectează în ocular în semicercul stîng și, invers, se întîmplă cu fasciculul luminos care trece prin cilindrul stîng.

Raza luminoasă reflectată pe oglinda „O" traversează două vase cilindrice C_1 şi C_2, dintre care unul conţine soluţia de studiat, iar celălalt soluţia de comparat, apoi trece prin prismă şi ajunge în ocular. Cilindrele de sticlă pot fi mişcate în sus şi în jos cu ajutorul unor şuruburi în faţa a două rigle gradate în milimetri. De obicei, vasul cu soluţie-etalon se fixează la o înălţime de 10 sau 20 cm. Înălţimea se fixează după intensitatea standardului.

Funcţionarea aparatului. Controlul aparatului se face în mod obligatoriu la începutul lecturii. Pentru punctul „O" al aparatului se ridică ambii cilindri pînă cînd ajung la capătul prismelor. Se centrează sursa de lumină şi se egalează claritatea celor două cîmpuri.

Privind prin ocular, cele două semicercuri au aceeaşi culoare, iar pe scările gradate din stînga şi dreapta aparatului se citeşte „O", aparatul este bun pentru funcţionare.

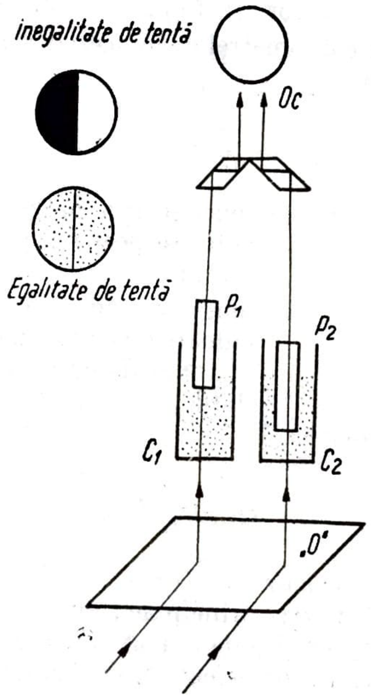


Fig. 6. — Schema colorimetrului tip Duboscq (explicaţii în text).

O altă metodă pentru controlul aparatului este umplerea celor doi cilindri cu aceeaşi soluţie. Dacă cele două semicercuri au aceeaşi intensitate de culoare pentru înălţimi egale, aparatul este bun pentru funcţionare. În caz contrar se fac 4—5 lecturi şi se face o medie.

De exemplu: se citeşte 20,3—20,2—20,1, deci media este 20,2.

Din lectura necunoscutei se va scădea 0,2 (eroarea), iar cifra obţinută se introduce în relaţia:

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{I_2}{I_1} \quad C_1 = \frac{C_2 I_2}{I_1}$$

C_1 = concentraţia soluţiei necunoscute;
C_2 = concentraţia soluţiei standard;
I_1 = înălţimea soluţiei necunoscute citite pe scara aparatului;
I_2 = înălţimea soluţiei standard — care este fixă — pe scara aparatului.

Colorimetria relativă este o metodă sigură şi exactă, dar depinde de soluţiile standard care trebuie exact preparate şi foarte bine conservate.

FOTOMETRUL PULFRICH

Aparatul se compune dintr-o sursă de lumină, un suport pentru cuve şi un fotometru (fig. 7).

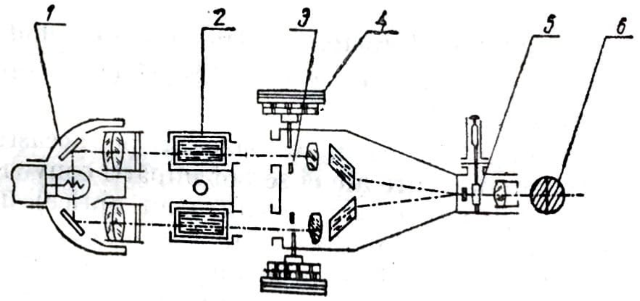


Fig. 7. — Fotometrul Pulfrich.
1 — oglinda becului; *2* — curele; *3* — diafragm; *4* — tamburul scalei; *5* — filtrele; *6* — cîmpul optic.

Sursa de lumină (1) este constituită dintr-un bec cu filament special alimentat de un transformator, două oglinzi aşezate în spatele becului în unghi de 45° una faţă de alta şi două condensatoare paralele.

Construcţia acestui dispozitiv este astfel realizată încît să furnizeze două fascicule luminoase paralele şi de intensitate egală.

Suportul pentru cuve (2) poate purta cuve de sticlă cu feţe paralele de diverse capacităţi, respectiv grosimi.

Fotometrul constituie partea optică a aparatului şi este format din două diafragme mobile (3), un sistem de lentile destinate liniarizării şi încrucişării celor două fascicule luminoase care au traversat cuvele, un filtru colorat (5) şi un ocular.

Sistemul de filtre al fotometrului cuprinde 12 filtre de sticlă sau metal-sticlă (filtre interferențiale), care lasă să treacă numai un fascicul îngust de raze de lumină vizibilă. Lărgimea spectrală a unui asemenea filtru este de 20 – 40 mμ. Notația de pe filtru indică lungimea de undă la care acesta are capacitatea maximă de transmitere. De exemplu, S_{61} înseamnă „spektral bereich" 610 mμ. În figura 8 se dau lungimile de undă ale filtrelor de sticlă colorate de la fotometrul Pulfrich -VEB C. Zeiss-Jena. Filtrele de sticlă ale fotometrului corespunzător romînesc au caracteristici apropiate. Cele de metal-sticlă transmit un fascicul cu lărgime spectrală mult mai redusă, în jurul a 10 mμ.

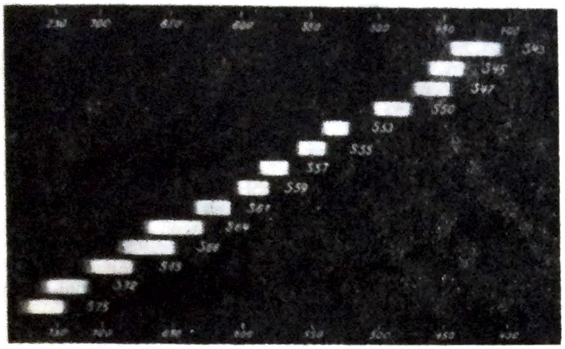


Fig. 8. — Lungimile de undă ale filtrelor Pulfrich.

Fotometrul Pulfrich poate fi transformat cu ușurință în electrocolorimetru prin înlocuirea ochiului observator cu o celulă fotoelectrică racordată cu un galvanometru prin intermediul unui releu fotomultiplicator.

Măsurarea concentrației unei soluții colorate cu ajutorul acestui instrument se bazează pe reducerea intensității fasciculului luminos care a traversat cuva cu soluție martor, considerată a avea D.O. = 0, pînă la egalitate cu intensitatea fasciculului care merge din soluția de cercetat. Reducerea intensității luminoase se face prin rotirea unui tambur gradat (4) (fig. 7) care acționează diafragma mobilă. Pe tambur sînt înscrise cu roșu cifrele corespunzătoare densităților optice sau extincția, și cu negru cifrele corespunzătoare transmisiei sau absorbția.

Aceste mărimi sînt legate între ele prin relația:

$$D.O. = \log \frac{I}{T},$$

în care:

$D.O.$ = densitatea optică;
T = transmisia.

La rîndul ei, transmisia se definește ca raportul dintre intensitatea luminii emergente (I) față de cea incidentă (I_0) pe cuva cu soluție colorată.

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Transmisia este, de obicei, dată în procente. Condiția esențială a reproductibilității determinărilor cu fotometrul Pulfrich sau cu echivalentul său construit de I.O.R. este verificarea paralelismului și egalității celor două fascicule luminoase care cad pe cuve.

Verificarea se face ridicînd sticlele mate din condensatorii sursei de lumină; privind în ocular prin filtrul S_{53} de preferință trebuie să vedem, fie imaginea din fig. 9 (la fotometrul Pulfrich german), fie două spirale incandescente formînd un unghi de 45° (la echivalentul romînesc).

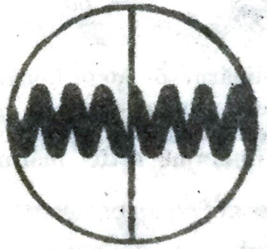


Fig. 9. — Imaginea de control la reglarea fotometrului Pulfrich.

Dacă umplem două cuve cu apă și le așezăm pe suportul lor, nuanțele celor două semicîmpuri care apar în ocular trebuie să fie egale la gradații egale ale tamburilor.

Modul de lucru constă în introducerea într-o cuvă a unei soluții colorate, în cealaltă găsindu-se lichidul martor — apa. Fasciculele emergente fiind încrucişate în ocular, vom manipula din tambur diafragma de partea opusă cuvei cu soluţia de analizat, aducînd la egalitate de nuanţă cele două semicîmpuri.

Diviziunea roşie găsită pe tambur ne dă densitatea optică a soluţiei colorate.

Concentraţia în substanţă colorată se află, fie prin comparare cu o soluţie standard, fie prin interpolare pe o curbă standard, realizată cu concentraţii bine determinate de soluţie-etalon.

Aflarea concentraţiei în ambele cazuri se face recurgînd la factorul de proporţionalitate F („factorul de pantă").

În acest caz $C = F.DO$

Dacă L (lungimea de strat) este egală cu unitatea, atunci F se poate calcula după formula :

$$F = \frac{C}{DO}$$

Teoretic, F trebuie să fie acelaşi pentru toate concentraţiile la care soluţia se conformă legii lui Beer (domeniul Beer). Practic, chiar în domeniul Beer pot exista variaţii, de obicei datorite factorilor subiectivi. De aceea este recomandabil să utilizăm media mai multor factori de proporţionalitate (b) care se află din relaţia :

$$F = \frac{\sum_{1}^{n} \frac{C}{DO}}{n}$$

unde n = numărul de determinări.

Factorul de proporţionalitate găsit pentru concentraţiile standard se introduce în formula $C = F.DO$, dîndu-ne astfel mărimea căutată.

ELECTROCOLORIMETRE

Factorul subiectiv de eroare este eliminat prin introducerea unei fotocelule racordată cu un galvanometru în locul ochiului uman. Primele electrocolorimetre lucrau prin compensare, avînd două fotocelule, dintre care una primea lumina emergentă dintr-o cuvă cu soluţie-martor. Ulterior, schema de construcţie s-a simplificat prin excluderea celulei de compensare. Electrocolorimetrele actuale folosesc o singură celulă fotoelectrică, intercalată într-o schemă electronică simplă. După cum se vede din fig. 10, fasciculul emergent (I) cade pe o celulă fotoelectrică (F), care deschide circuitul galvanometrului (G). Între celulă şi cuva cu soluţie sau între sursa de lumină şi cuvă se introduc filtre colorate.

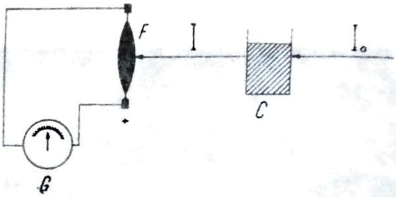


Fig. 10. — Schema fotocolorimetrului.

În fig. 11 se vede exteriorul unui tip de electrocolorimetru. Modul de lucru cu acest tip de aparat este următorul :

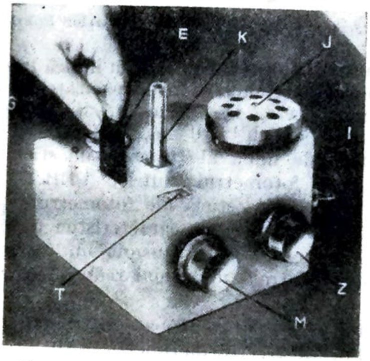


Fig. 11. — Electrocolorimetru (explicaţii în text).

1. Se introduce filtrul ales în fanta respectivă.
2. Se introduce lichidul martor în cuva sau eprubeta respectivă (K).
3. Se conectează aparatul la reţea (respectiv la acumulator sau transformator) deschizînd comutatorul (I).
4. Se aduce scara densităţilor optice (T) la 0, cu butonul M, apoi acul galvanometrului G la poziţia 0, mişcînd butonul Z.
5. Se închide comutatorul I.
6. Se înlocuieşte soluţia martor cu soluţie de cercetat.
7. Se deschide comutatorul I.
8. Se aduce acul galvanometrului G înapoi la 0, mişcînd butonul M.

9. Se citeşte densitatea optică pe cadranul *T*.

Calculul concentraţiilor se face la fel cum s-a arătat mai sus pentru fotometrul Pulfrich sau I.O.R.

TURBIDIMETRIA

Turbidimetria permite determinarea opalescenţei unei soluţii prin comparaţie cu opalescenţa produsă de soluţia cu concentraţie cunoscută. Aparatele folosite sînt nefelometre speciale, colorimetre sau chiar fotometrul Pulfrich. Ca şi în colorimetrie, se aplică legea Bouguer-Beer. Grosimile straturilor opalescente sînt invers proporţionale cu concentraţiile lor.

La fotometrul tip I.O.R. se poate monta şi un dispozitiv de nefelometrie, în acest caz lucrîndu-se cu filtrele L ale căror caracteristici sînt prezentate în tabelul 17.

TABELUL 17

Denumirea filtrului	Maximum de transparenţă în *A*	Transparenţa maximă *T*%
L_1	6 200	85
L_2	5 200	65
L_3	4 500	12

SPECTROFOTOMETRUL

O prismă de cuarţ este capabilă să descompună lumina albă în luminile componente. Fasciculele colorate părăsesc prisma, formînd un anumit unghi cu ea. Dacă o asemenea prismă este conţinută într-o cutie prevăzută cu o fantă suficient de subţire, mişcînd prisma cu un vernier se poate selecta un fascicul luminos practic monocromatic. Un asemenea dispozitiv sau cele derivate din el se numeşte monocromator. Un electrocolorimetru în care filtrele colorate sînt înlocuite cu un monocromator poartă numele de spectro-fotometru. Aceste instrumente au o precizie foarte mare. Un avantaj important al spectrofotometrelor este gama spectrală largă pe care o cuprind. Monocromatoarele obişnuite sînt capabile să dea fascicule de circa 1 $m\mu$ de la 180 la 2 000 $m\mu$, incluzînd deci domeniile ultraviolet şi infraroşii apropiate ale spectrului.

Spectrofotometrul Beckman, unul din cele mai răspîndite, are în toate variantele sale constructive aceeaşi schemă optică.

Schema electronică este foarte complicată la aceste aparate din cauza etajelor de amplificare necesare pentru traducerea galvanometrică a curentului de excitaţie generat de fotocelulă.

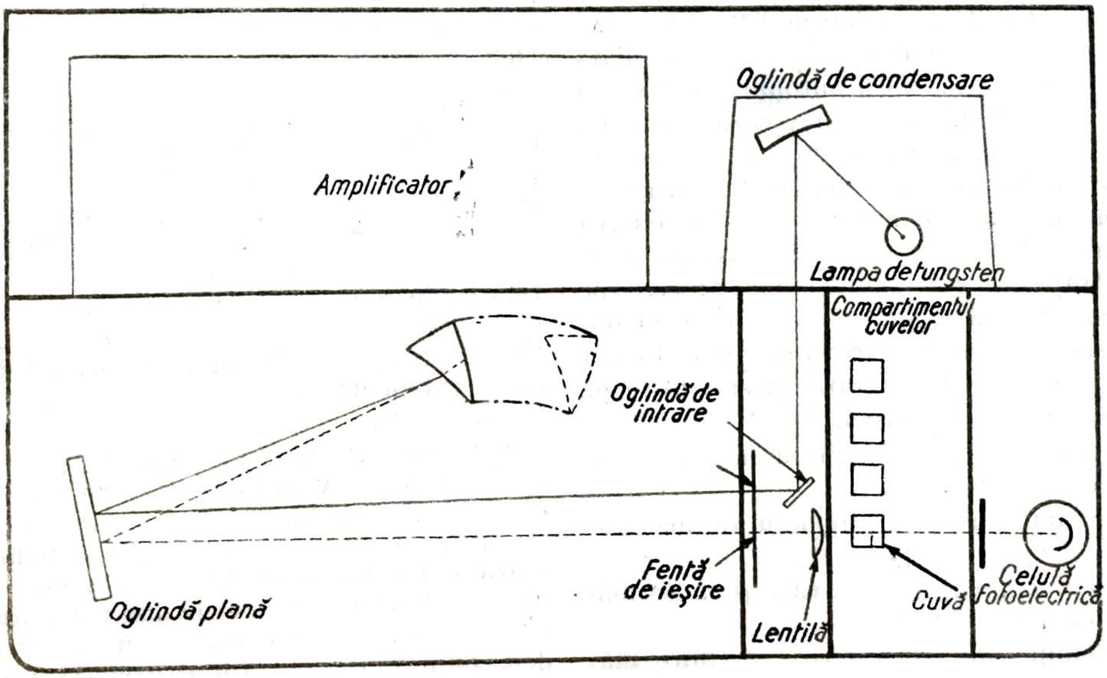


Fig. 12. — Schema optică a spectrofotometrului Beckman.

Figura 12 reprezintă spectrofotometrul Beckman, modelul DB, cel mai avantajos pentru măsurătorile rapide, utilizate în laboratorul clinic. Modul de lucru cu spectrofotometrul este foarte simplu : se fixează de la început la *0* (o dată pentru totdeauna) acul galvanometrului cu şurubul 8. După conectarea la reţea şi un timp de 15 minute necesar încălzirii, se fixează lungimea de undă pe scală (7) cu ajutorul butonului 3. Se introduc cuvele cu martorul şi probele în locaşul respectiv şi se manevrează cu butonul 5. Cu butonul 2 se face zero-ul aparatului, avînd în cuvă apă distilată sau martorul respectiv. Cu butonul 4 se fixează deschiderea fantei (se manevrează butonul, pînă ce acul galvanometrului ajunge pe indicaţia 100), iar cu butonul 1 se fixează sensibilitatea dorită. Închiderea şi deschiderea sistemului se fac cu butonul din dreapta aparatului. După ce s-a stabilit punctul zero pe martor cu butonul 2 şi s-a fixat fanta cu butonul 4, se aduce prin rotirea butonului 5 cuva cu proba, se deschide aparatul şi se citeşte pe cadran extincţia respectivă.

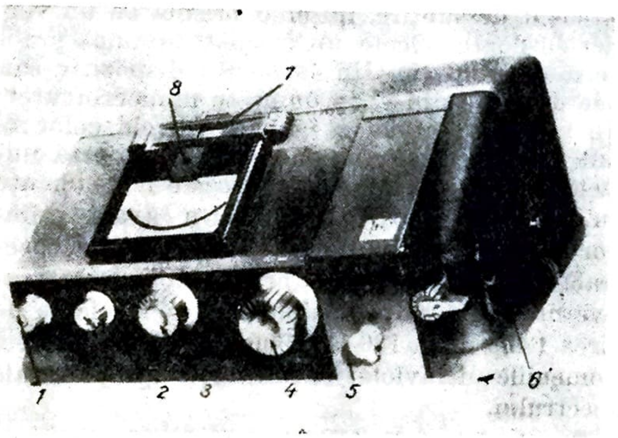


Fig. 13. — Spectrofotometrul Beckman (explicaţii în text).

Distingem 3 domenii de lucru în spectrofotometria curentă :

a) Domeniul „vizibil", care permite măsurători între 400 şi 700 mμ.

b) Domeniul „ultraviolet", care permite măsurători pînă la 400 mμ.

c) Domeniul „infraroşu", care permite măsurători peste 700 mμ.

FOTOMETRIA CU FLACĂRĂ

Este o metodă de analiză cantitativă, permiţînd determinarea concentraţiei metalelor alcaline şi alcalinoteroase, dintr-o soluţie. Principiul metodei este bazat pe faptul că intensitatea luminoasă a radiaţiilor unui spectru de flacără este în funcţie de numărul atomilor excitaţi şi deci de cantitatea elementului respectiv.

Determinarea cantitativă a substanţelor solubilizate se realizează după metoda flăcării a lui Lungegartg şi Lehuhknecht.

Serul diluat în apă distilată este fin pulverizat cu ajutorul unui pulverizator de sticlă alimentat cu aer comprimat; amestecul aerosol-gaz este condus într-un arzător cu o anumită structură, unde se face aprinderea amestecului acetilen-aer. Selecţionînd cu ajutorul unui filtru de interferenţă liniile spectrale ale elementului căutat, lumina flăcării cade pe o celulă fotoelectrică, al cărei fotocurent se măsoară prin intermediul unui galvanometru.

Principiul de funcţionare a aparatului. Pentru a se obţine rezultate corecte, este necesar să se menţină constante condiţiile de funcţionare a aparatului şi a flăcării, concentraţia soluţiei apărînd ca singura variabilă. Prin intermediul reductorilor de presiune bigraduali se efectuează o relaţie constantă între presiunea acetilenei şi a aerului comprimat. Reductorul coboară în prim grad presiunile acetilenei şi aerului comprimat, iar în al doilea grad reglează presiunile respective la valoarea dorită exact. Cu ajutorul acestor două grade de reducţie se poate lucra întotdeauna la aceeaşi presiune. Presiunile acetilenei şi ale aerului comprimat sînt redate de manometrul fin pentru aer şi de manometrul cu apă pentru acetilenă. Filtrele Linter, introduse în conductă, opresc impurităţile gazelor şi slăbesc curentul de aer şi acetilenă. Atenţie ! Se deschide, în primul rînd, manometrul pentru aer şi apoi manometrul pentru acetilenă.

Substanţa lichidă este aspirată prin duza de lichid în urma vidului produs de duza pentru aer comprimat. Bila de sticlă aflată în imediata apropiere a duzelor pentru aer şi lichid realizează reducerea particulelor de lichid produse prin pulverizare. Picăturile mai mari din curentul de ceaţă sînt condensate în vasul cu bile, deci numai o ceaţă fin dispersată ajunge în brenner. Acetilena se racordează la camera de amestec, trecînd apoi la brenner. Brennerul este legat de pulverizator prin intermediul camerei de amestec.

Partea optică constă dintr-o oglindă concavă, un compensator special cu diafragmă, un fotoelement cu seleniu, un geam mat. Oglinda concavă prinde lumina flăcării şi o proiectează pe fotoelementul cu seleniu. Compensatorul special prevăzut cu lentile micşorează reflexia şi creează o utilizare cît mai mare a luminii. Cu ajutorul diafragmului iris, luminozitatea poate fi scăzută sau crescută, aşa încît oscilaţiile galvanometrului să se găsească în cîmpul de măsurare cel mai favorabil.

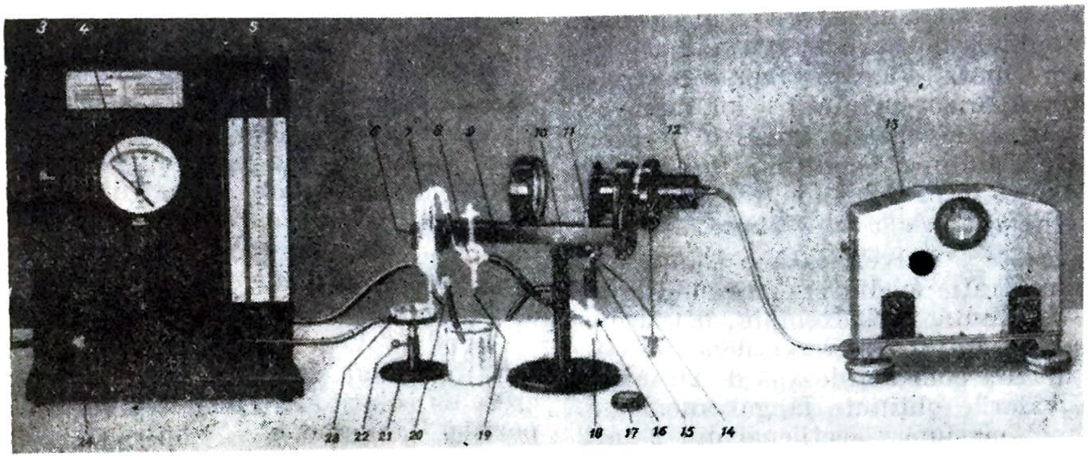


Fig. 14. — Fotometrul cu flacără tip Zeiss.

1 — furtun de la bomba cu acetilenă; *2* — furtun de la bomba cu aer; *3* — planşa manometrică; *4* — manometru fin pentru aer; *5* — manometru cu apă pentru acetilenă; *6* — şurub pentru fixarea pulverizatorului; 7 — pulverizator; *8* — bilă pentru trecerea aerosolilor spre flacără; *9*—*10* — suport pentru partea optică; *11* — bec; *12* — celulă fotoelectrică; *13* — galvanometru; *14* — şurub pentru fixarea becului; *15* — furtun pentru amestecul aerosol acetilenă; *16* — vasul pentru amestecarea aerosolului cu acetilenă; *17* — şaiba mată; *18* — furtun cu clemă pentru evacuarea lichidului strîns; *19* — furtun cu clemă pentru evacuarea lichidului strîns; *20* — capilar pentru absorbţia probei; *21* — masă suport pentru probă; *22* — buton pentru reglarea mesei; *23* — vas Petri; *24* — filtru pentru acetilenă.

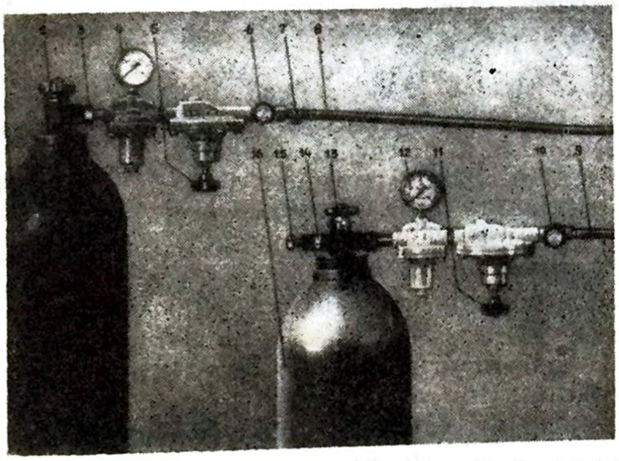


Fig. 15. — Bomba de aer comprimat şi acetilenă cu accesoriile respective de la fotometrul cu flacără.

1 — Butelia de aer; *2* — şurub pentru deschiderea bombei de aer; *3* — piuliţă de legătură dintre bombă şi reductor; *4* — manometru; *5* — şurub în cruce; *6* — şurub în stea; *7* — piuliţă de legătură între reductor şi furtun; *8* — furtun; *9* — furtun; *10* — şurub în stea; *11* — şurub în cruce; *12* — manometru; 13 — şurubul de deschidere a bombei de acetilenă; *14* — şurub de fixare a manometrului; *15* — şurub de fixare a manometrului; *16* — bomba de acetilenă.

Filtrul trebuie să aibă o permeabilitate mare pentru lumina emisă de proba de examinat şi impermeabilitate pentru lumina dată de elementele străine pe care le conţine proba.

Celula fotoelectrică trebuie să fie sensibilă şi constantă pe un domeniu larg de lungimi de undă; deschiderea şi închiderea ei sînt realizate cu un declanşator automat.

Galvanometrul cu scală indică valorile date de fotocelulă. Oscilaţiile sînt uşor vizibile, graţie scalei mobile (gradată de la 0 la 1 000) care se deplasează în faţa unui ac indicator ce este fix.

Etalonarea aparatului. După ce toate conexiunile au fost realizate conform figurilor 14 şi 15, trebuie etalonată imaginea flăcării şi stabilirea condiţiilor optime de excitaţie.

Flacăra se etalonează în modul următor: se aprinde amestecul acetilenă-aer la o presiune de 40 mm/0,20. Trebuie să se obţină un con albastru, rigid, arzînd liniştit, cu un vîrf cît mai imobil posibil. Conurile de flacără, de la suprafaţa arzătorului, de culoare albastră-verzuie, nu trebuie să depăşească 2—3 mm.

Dacă acetilena este impură, se obţine o flacără galbenă. În acest caz trebuie utilizat un vas spălător cu H_2SO_4 concentrat.

Cînd în amestec există un exces de acetilenă, în jurul conurilor apare un feston roşu, iar flacăra devine deschisă şi strălucitoare. La un exces de aer, arderea produce zgomot şi flacăra se micşorează, tinzînd să se stingă.

Porţiunea selectivă a flăcării se găseşte imediat deasupra conurilor albastre-verzui şi se reglează prin oglinda concavă a sistemului optic, utilizînd şaiba mată. Flacăra trebuie potrivită de aşa manieră, încît imaginea celor două conuri care apar să fie în afara imediată a cercului desenat. Stabilirea condiţiilor optime de excitaţie se face prin determinarea aşa-numitului *punct de inversiune al acetilenei.*

Pentru aceasta se pulverizează o soluţie-etalon de o concentraţie medie, la o presiune de aer menţinută constantă (de exemplu, 0,4 atmosfere). Se stabileşte presiunea acetilenei la o diferenţă de nivel a coloanei de apă de 20 mm şi se notează valorile obţinute la galvanometru. Se ridică apoi presiunea acetilenei din 2 în 2 diviziuni, prin răsucirea cu grijă a şurubului în stea, în sensul acelor ceasornicului şi se notează pentru fiecare valorile citite la galvanometru. Se reprezintă rezultatele grafic. Punctul maxim al valorilor citite la galvanometru după care curba începe să scadă reprezintă *punctul de inversiune al acetilenei.* Presiunea corespunzătoare reprezintă presiunea optimă de lucru.

Metoda de lucru. Manipularea fotometrului cu flacără nu solicită condiţii de obscuritate. Se deschide robinetul bombei de aer comprimat şi se reglează presiunea, astfel încît manometrul fin să arate o presiune de 0,20—0,30 atmosfere.

Se deschide progresiv bomba de acetilenă şi se reglează presiunea pînă la o diferenţă de nivel între cele două coloane cu apă de 30—40 mm.

După 10 secunde, cînd s-a realizat o omogenizare a acetilenei cu aerul comprimat, se aprinde amestecul gaz-aerosol la duza lămpii. Flacăra trebuie să fie rigidă, iar conul flăcării deasupra duzei să aibă o înălţime de 2—3 mm.

Pentru a obţine măsurători reale, trebuie create condiţii de excitaţii optime şi constante, stabilind raportul favorabil de presiuni între acetilenă şi aerul comprimat. După realizarea raportului favorabil de presiune se lasă aparatul deschis timp de 20 de minute, pulverizînd o soluţie de concentraţie medie, cu filtrul interpus pentru a crea o constanţă a fenomenului fotoelectric.

— Se controlează punctul „0'' al galvanometrului; diafragmul trebuie deschis la 2/3—3/4 din diametrul său total.

— Se determină apoi pe loc valoarea solventului, apă distilată, care trebuie scăzută din toate valorile măsurate.

Apoi se determină curbele de etalonare pentru Na^+, K^+, Ca^{++}.

Stabilirea curbei etalon. Începînd cu pulverizarea concentraţiilor slabe, se citesc indicaţiile galvanometrului şi se înscriu pe hîrtie milimetrică concentraţiile pe ordonată, iar intensitatea curentului galvanometrului pe abscisă.

Se construieşte o curbă-etalon, al cărui traiect se modifică după caracteristicile substanţei studiate. După trasarea curbei-etalon se trece la măsurarea diluţiei de cercetat.

Avînd în vedere existenţa ionilor perturbatori din serul sanguin, este indicat să se lucreze cu soluţii-etalon care să corespundă compoziţiei sanguine.

După terminarea determinărilor se vor închide întîi robinetul acetilenei, apoi aerul comprimat. Trebuie respectată ordinea deschiderii şi închiderii bombelor de aer comprimat şi acetilenă. Toate accesoriile aparatului — reductoare, manometre, galvanometru, celulă fotoelectrică — trebuie să fie readuse la 0.

Avantajele metodei :

1. Rapiditatea metodei reprezintă o superioritate faţă de celelalte determinări chimice de cationi. După realizarea lucrărilor pregătitoare, timpul necesar metodei propriu-zise pentru determinări de Na^+, K^+, Ca^{++} pe o probă este între 2 şi 3 minute.
2. Limita de eroare corespunde celei analizelor chimice, 2—3%.
3. Consumul minim de substanţă prezintă un avantaj deosebit pentru clinică.

Determinarea sodiului

Soluţia-etalon : 25,418 1 g NaCl sînt dizolvate în 1 000 ml apă într-un balon cotat.

1 ml din acestă soluţie corespunde la 10 mg Na.

Din soluţia-etalon se fac 3 soluţii de diferite concentraţii, care servesc la trasarea curbei-etalon :

— soluţia I conţine 2,5 ml soluţie mamă + 97,5 ml apă ;

— soluția a II-a conține 3 ml soluție mamă + 97 ml apă.

— soluția a III-a conține 3,5 ml soluție-mamă + 96,5 ml apă.

Curba-etalon se verifică în fiecare zi de lucru.

Curba obținută pentru Na nu este liniară.

Proba de cercetat. Sînge. 1 ml ser se diluează la 100 ml apă în balon cotat.

Urina. 1 ml urină se diluează tot la 100 ml apă.

Diluțiile probelor de cercetat sînt puse în vasul Petri, pentru a fi pulverizate, iar valorile citite la galvanometru cu filtrul respectiv sînt raportate la curba etalon.

Determinarea calciului

Se prepară 3 soluții-etalon:

— soluția I conține 0,125 g $CaCO_3$ + 50 ml ClH + 7,880 g $ClNa$ + 0,360 g ClK dizolvate în 1 000 ml apă = soluția corespunde la o concentrație de 5 mg Ca la % ml;

— soluția a II-a conține 0,250 g CO_3Ca + + 50 ml ClH + 7,880 g $ClNa$ + 0,360 g ClK + + 1 000 ml apă = 10 mg Ca%;

— soluția a III-a conține 0,375 g $CaCO_3$ + + 50 ml ClH + 7,880 g $ClNa$ + 0,360 g ClK + 1 000 ml apă = 15 mg Ca%.

Soluțiile I, a II-a și a III-a sînt diluate 1/20 și servesc la trasarea curbei-etalon.

Proba de cercetat. Sînge. 1 ml ser se diluează cu 19 ml apă distilată în balon cotat, diluție 1/20.

Urina. Identic ca la sînge. În caz că urina conține K mai mult se diluează urina 1% și se ține seama la calcul.

Diluțiile probelor de cercetat sînt puse în vasul Petri, pentru a fi pulverizate, iar valorile citite la galvanometru cu filtrul respectiv sînt raportate la curba etalon.

Determinarea potasiului

Soluția stoc: 0,955 1 g ClK sînt dizolvate în 1 000 ml apă la balon cotat.

Soluția conține 5 mg K% ml.

Soluția solvent conține 1,387 5 g Cl_2Ca + + 41,96 g $ClNa$ dizolvate în 1 000 ml apă la balon cotat.

Din soluția stoc se fac următoarele diluții:

a) 1 ml soluție stoc + 1 ml soluție solvent se aduc la 100 ml;

b) 2 ml soluție stoc + 1 ml soluție solvent se aduc la 100 ml;

c) 3 ml soluție stoc + 1 ml soluție solvent.

Curba obținută este liniară.

Proba de cercetat. Sînge. 1 ml ser se diluează la 20 ml apă distilată în balon cotat.

Urina. Se procedează ca pentru sînge.

Diluțiile probelor de cercetat sînt puse în vasul Petri pentru a fi pulverizate, iar valorile citite la galvanometru cu filtrul respectiv sînt raportate la curba etalon.

FOTOFLUOROMETRIA

Se numește fotoluminiscență, proprietatea anumitor corpuri de a emite în toate direcțiile, cînd primesc o radiație de lungime de undă λ_0 radiații de lungime λ_1, astfel ca $\lambda_1 > \lambda_0$.

Distingem 2 tipuri de fotoluminiscență după persistența emisiunii de radiații, la încetarea luminării: fluorescență cu persistență nulă și fosforescență cu persistență durabilă.

Fluorescența se poate produce cu ajutorul radiațiilor vizibile, al radiațiilor ultraviolete sau al razelor X.

Măsurarea fluorescenței se face cu ajutorul fotofluorometrelor. Un aparat de fluorometrie comportă următoarele dispozitive: o sursă de raze ultraviolete (u.v.), un dispozitiv de filtre care elimină radiațiile inactive (*F*), două celule fotoelectrice (C_1 și C_2), una de referință și alta de măsură, o cuvă *K* pentru soluția de analizat, două diafragme (D_1 și D_2), dintre care una

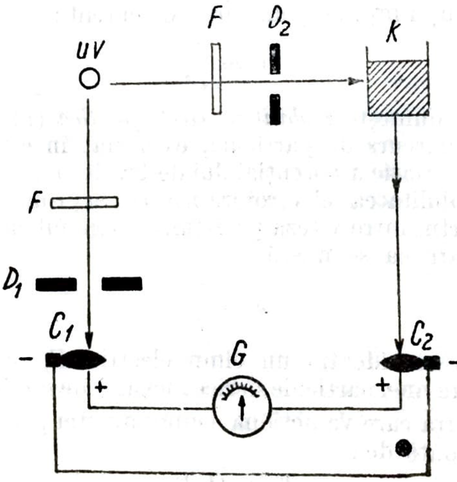


Fig. 16. — Schema de funcționare a fluorometrului (explicații în text).

gradată (D_2), permițînd reglarea luminii ce ajunge la cuva cu soluția fluorescentă și un galvanometru de zero (G) care servește ca instrument de măsură.

Soluția fluorescentă se comportă ca o sursă de lumină. Dacă se studiază spectrul de emisie — cu ajutorul unui dispozitiv spectral — se obțin așa-numitele spectre de fluorescențe.

Mai puțin utilizate în analiza laboratorului clinic, ele sînt întrebuințate la caracterizarea unei întregi serii de componente biochimice: vitamine, hormoni, pigmenți etc.

METODE ELECTRICE

ELECTROFOREZA

BAZELE TEORETICE ALE FENOMENULUI

Se numește *electroforeză* migrarea particulelor încărcate electric dintr-o soluție coloidală spre polul (+) sau (—), la trecerea unui curent electric.

Se numește *ionoforeză* deplasarea în cîmpul electric a ionilor de dimensiuni relativ mici.

Considerații teoretice: *viteza de deplasare a particulelor în cîmp* se face conform legii Coulomb, direct proporțional cu încărcătura lor electrică și invers proporțional cu pătratul distanței față de polii sursei de curent:

$$V = \frac{E}{D^2}$$

Se numește *mobilitate electroforetică* (u) drumul parcurs de particulă, exprimat în cm/sec. la o variație a potențialului de 1 volt/cm.

Mobilitatea electroforetică se exprimă prin raportul între viteza particulei și cîmpul electric în care ea se mișcă.

$$u = \frac{V}{E}$$

Să considerăm un cîmp electric E, lucrînd asupra unei particule sferice „ideale'' de sarcină Q.

Forța care va acționa asupra acestei particule este dată de:

$$F_1 = Q.E$$

Dar deplasarea particulei de sarcină Q sub forța F este impiedicată de vîscozitatea mediului în care are loc migrarea.

Forța acestei viscozități (F_2) este dată de legea lui Stokes:

$F_2 = 6\pi\ r\ v\ n$, în care: r = raza particulei;
v = viteza de deplasare
n = coeficientul de viscozitate a mediului.

Mobilitatea electroforetică va fi expresia celor 2 factori F_1 și F_2 și va începe numai cînd $F_1 \geqslant F_2$.

Să considerăm

$$F_1 = F_2$$

$$Q.E = 6\pi\ r\ v\ n$$

$$E = \frac{6\pi\ r\ v\ n}{Q}$$

introducînd pe E în expresia mobilității electroforetice, avem:

$$u = \frac{Qv}{6\pi\ r\ v\ n} = \frac{Q}{6\pi\ rn}$$

Distanța pe care va migra particula este determinată de produsul mobilității (u) și al gradientului de potențial (ΔE), în funcție de timpul cît durează aplicarea curentului:

$$D = u \times \Delta E \times T$$

Gradientul de potențial (ΔE) depinde de conductibilitatea soluției respective, secțiunea vasului și intensitatea curentului utilizat.

CONSIDERAȚII FIZICO-CHIMICE ASUPRA ELECTROFOREZEI PROTEINELOR

Se știe că, în soluții apoase, moleculele de proteină se încarcă electric.

Constituenții elementari proteici — aminoacizii — sînt *substanțe amfotere*, funcționînd în mediul acid ca baze și în mediul bazic ca acizi.

$$^{+}H_3N - R - COO^{-} + {}^{+}HCl^{-} \rightleftarrows {}^{+}H_3N - R - COOH + Cl^{-}$$

$$^{+}H_3N - R - COO^{-} + {}^{+}KOH^{-} \rightleftarrows H_2N - R - COO^{-} + HOH + K^{+}$$

Se numește pH izoelectric, pH la care disociația acidă egalează pe cea bazică. La acest pH, încărcătura electrică va fi nulă și nu vom avea migrare. Deasupra sau dedesubtul acestui punct particulele se vor încărca electric și se vor deplasa spre unul din polii sursei de curent (fig. 17).

— Să considerăm cazul unei molecule de proteină — supusă migrării — sub acțiunea unui cîmp electric.

Considerăm pentru început cazul unei proteine A pure. Supusă cîmpului electric, ea se va deplasa spre unul din poli, în funcţie de încărcătura mediului (pH soluţiei).

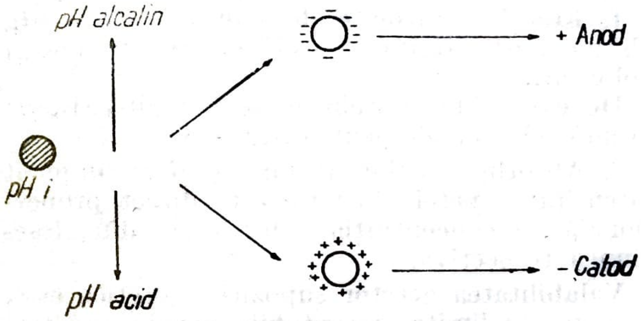


Fig. 17. — pH şi încărcarea electrică a proteinelor.

După un anumit timp se poate stabili drumul parcurs spre polul respectiv. Pentru măsurarea acestuia se ia ca punct de reper „frontul de migrare'' (marginea spotului).

— Să considerăm cazul a două proteine, A şi B, în acelaşi mediu şi la acelaşi curent. Migrarea va depinde, în acest caz, numai de încărcătura electrică a particulelor A şi B.

Două cazuri sînt posibile:

— sau A^+ şi B^-, şi atunci fiecare moleculă se va îndrepta spre alt pol;

— sau ambele au aceeaşi încărcătură şi vor migra spre acelaşi pol.

În acest caz însă, cum $A \neq B$, urmează că şi sarcina electrică a lui $A \neq B$. Migrarea făcîndu-se în funcţie de încărcătură (ψ), molecula cu sarcină mai mare va migra mai mult.

Este evident faptul că electroforeza devine un excelent mijloc de separare şi de studiu al fracţiunilor proteice.

De remarcat că, dacă proteina se află într-un complex, antrenarea ei în cîmpul electroforetic va duce la antrenarea întregului ansamblu.

Astfel se pot separa şi determina nu numai componente proteice, ci şi aşa-numitele „cenapse'', cum ar fi „cenapsele glicoproteice'' şi „cenapsele lipoproteice''.

— Din considerentele teoretice de mai sus rezultă că, pentru executarea unei fracţionări electroforetice, sînt necesare 2 condiţii.

A. Crearea unui dispozitiv care să permită proteinei să se menţină tot timpul în limitele unui pH bine determinat. (El va determina încărcătura electrică şi sensul de migrare).

B. Crearea unui dispozitiv care să permită aplicarea unui potenţial electric uniform şi constant.

A. Menţinerea proteinei în limitele unui pH fix şi bine stabilit se face cu aşa-numitele „tampoane pentru electroforeză''. Ele împiedică, prin disocierea lor, variaţia pH, dincolo de valoarea tamponului.

De exemplu: tamponul de borat: acid boric şi borat Na, pH = 8,6.

Introducerea unei soluţii de proteină în acest mediu nu modifică pH, fiindcă disociază după nevoi, fie acidul, fie sarea sa şi neutralizează efectul dinafară.

Un tampon electroforetic „eficient'' trebuie să prezinte următoarele caracteristici:

1. Să aibă capacitatea de tamponare eficientă (să ştim exact la ce pH lucrăm).
2. Ambii ioni ai tamponului trebuie să aibă aceeaşi viteză de migrare, pentru a evita distribuirea inegală a ionilor din tampon în urma fenomenului de ionoforeză.
3. Să aibă un pH situat în jurul pH de 8,5; în acest caz toate proteinele se comportă ca anioni şi diferenţa lor de mobilitate este cea mai potrivită pentru separarea fracţiunilor.

Pentru scopuri cu totul speciale se pot utiliza şi alte pH-uri.

Caracteristica unui tampon în electroforeză se dă prin pH şi prin aşa-numita „forţă ionică'' (μ) sau (Φ) care exprimă concentraţia *efectivă* (existentă) a ionilor dintr-o soluţie

$\mu = \sum \frac{C_i \cdot Z_i^2}{2}$, în care: C_i = concentraţia molară a ionului respectiv;
Z_i = numărul sarcinilor sale electrice.

De exemplu, să calculăm forţa ionică a unei soluţii 0,1 M de $BaCl_2$

$$\begin{array}{l|l} Ba^{++} & \\ 2\ Cl^- & \end{array} \mu = \frac{10^{-1} \cdot 2^2 + 2.10^{-1} \cdot 1^2}{2} = \frac{0,6}{2} = 0,3$$

În general, μ trebuie să fie cuprins între 0,1 şi 0,2; valori $< 0,1$ duc la etalarea fracţiunilor; $> 0,2$ duc la migrare prea rapidă şi la neseparare.

B. Crearea dispozitivului care să permită aplicarea unui potenţial electric uniform şi constant duce principial la 2 sisteme mari de electroforeză:

1. Sistemul în care proteina, menţinută în soluţia-tampon, migrează în interiorul unei faze lichide. Este aşa-numita *electroforeză li-*

beră, aparatele tip fiind aparatul Tiselius, aparatul Kern, puțin întrebuințate astăzi, deoarece sînt costisitoare și necesită manipulare de lungă durată.

2. Sistemul în care proteina, menținută în soluție - tampon, migrează adsorbită pe o fază solidă este așa-numita *electroforeză de zonă.*

Electroforeza liberă. Proteina migrează în interiorul unui tub în formă de *U*, eșalonîndu-se pe una din ramuri.

Înregistrarea fracțiunilor proteice se face cu ajutorul sistemelor optice. Asupra particulelor proteice eșalonate se proiectează un fascicul de raze monocromatice, care difractă — și sînt apoi prinse pe un film.

Se obține astfel imaginea unei curbe cu mai multe croșete, fiecare croșet corespunzînd fracțiunii respective.

Evaluarea cantitativă se face, în acest caz, măsurînd suprafața curbelor obținute.

Electroforeza de zonă. Proteina migrează, în acest caz, de-a lungul unui suport solid, umectat în soluția tampon. Este tipul cel mai curent utilizat în laborator pe suporturi ca :

— hîrtie de filtru ;
— geloză ;
— amidon ;
— suporturi celulozice.

Electroforeza de zonă, foarte comodă, ridică însă o problemă teoretică și practică specială.

În timp ce particula proteică încărcată (—) este antrenată spre anod, totalitatea soluției (și deci și particulele proteice înglobate în ea) este antrenată sub efectul curentului electroosmotic (rezultat al fenomenelor electrice de la nivelul texturii fine a suportului spre catod (fig. 16).

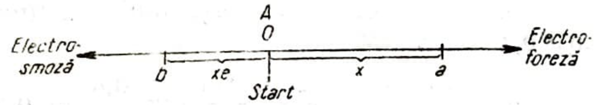


Fig. 18. — Fenomenul de electroosmoză și electroforeză.

Mobilitatea electroforetică *reală*, în acest caz, este rezultanta celor 2 forțe, deci suma lui $(+x)$ și $(-x_e)$.

În acest caz vom avea :

$$\frac{u}{u_e} = \frac{x+x_e}{x_e} = 1 + \frac{x}{x_e},$$

de unde :

$$u = u_e\left(1 + \frac{x}{x_e}\right)$$

Aceasta este formula mobilității electroforetice în cazul electroforezei de zonă.

Revelarea particulelor fracționate se face în acest caz prin colorare.

Tehnica are la bază 2 supoziții de ordin teoretic, verificate de criteriul practic :

1. Fracțiunile izolate, de o anumită structură chimică, au afinități specifice, pentru diferiți coloranți.

De exemplu : proteinele pentru albastru de bromfenol, lipidele pentru negru Sudan.

2. Absorbția colorantului și deci implicit intensitatea petei obținute este direct proporțională cu concentrația substanței, din fracțiunea respectivă.

Valabilitatea acestor supoziții teoretice este, în anumite limite, acceptabilă pentru practica curentă.

PRACTICA ELECTROFOREZEI PE HÎRTIE

Metoda constă în aplicarea serului de analizat sub formă de picătură sau dungă pe o hîrtie de filtru îmbibată cu soluție-tampon și așezată într-un cîmp electric. Sub tensiunea curentului electric aplicat la capetele benzii de hîrtie, se desfac fracțiunile componente care pot fi puse în evidență cu ajutorul coloranților. Spoturile colorate pot fi evaluate prin fotometrare directă sau prin eluare.

Din punctul de vedere al modului de așezare a hîrtiei, în camera umedă se disting 4 metode de electroforeză.

1. Metoda hîrtiei suspendate.
2. Metoda hîrtiei între plăci de sticlă.
3. Metoda hîrtiei sub evaporare continuă.
4. Metoda hîrtiei în extensie liberă.

Se va descrie în amănunt metoda hîrtiei în extensie liberă, deoarece este metoda curentă în laboratorul clinic.

A. *Reactivii* : Soluții-tampon. La toate sistemele tampon se adaugă 0,1 g mertiolat la 1 000 ml soluție-tampon, pentru conservare.

1. Tampon veronal pH 8,6 f.i. 0,075 :	
acid dietil-barbituric	2,76 g ;
dietil-barbiturat de sodiu	15,40 g ;
apă distilată	1 000 ml.
2. Tampon veronal pH 8,6 f.i. 0,05 :	
acid dietil-barbituric	1,84 g ;
dietil-barbiturat de sodiu	10,30 g ;
apă distilată	1 000 ml.
3. Tampon veronal pH 8,6 f.i. 0,025 :	
acid dietil-barbituric	0,42 g ;
dietil-barbiturat de sodiu	5,15 g ;
apă distilată	1 000 ml.

4. Tampon borat pH 8,6 f.i. 0,025 :	
acid boric	2,35 g ;
borat de sodiu	4,4 g ;
apă distilată	1 000 ml.
5. Tampon fosfat pH 7,4 f.i. 0,025 :	
fosfat monosodic	0,6 g ;
fosfat disodic	2,2 g ;
apă distilată	1 000 ml.
6. Tampon Mihaelis pH 8,5 f.i. 0,1 :	
a) Soluție stoc :	
acetat de sodiu	20 g ;
dietil barbiturat de sodiu	30 g ;
apă distilată	1 000 ml.
b) soluție-tampon pentru ser :	
soluție stoc	200 ml ;
clorură de sodiu 8%	20 ml.
acid clorhidric N	5 ml ;
apă distilată	775 ml.
c) Soluție-tampon pentru plasmă :	
soluție stoc	200 ml ;
clorură de sodiu 8,5%	10 ml ;
acid clorhidric N	5 ml ;
oxalat de potasiu	2 g ;
apă distilată	775 ml.

B. *Coloranții* întrebuințați în metoda electroforezei sînt specifici pentru fracțiunile proteice, lipoproteice și glicoproteice. Prepararea lor va fi descrisă la capitolele respective.

C. *Hîrtia de filtru*. În electroforeză se întrebuințează o hîrtie de filtru specială cu următoarele însușiri : absorbție minimă și egală pentru diferitele fracțiuni ; structura omogenă și grosime egală pe toată suprafața ; hîrtia de filtru Whatman nr. 1, 4 și 100 este hîrtia folosită atît în cromatografie, cît și în electroforeză ; benzile de hîrtie au dimensiuni diferite după aparatul cu care se lucrează (lungime 20, 30, 40 cm ; lățime 2, 3, 6 cm).

D. *Aparatul de electroforeză* este compus din următoarele părți :

1. redresor ;
2. cameră umedă sau cuvă ;
3. electrozi.

1. *Redresorul* este alimentat de curentul electric sau baterie anodică. El trebuie să posede dispozitive de reglare pentru a putea livra un curent de voltaj și amperaj standardizat. Dăm în fig. 19 un redresor de electroforeză tip Beckmann și în fig. 20 un aparat complet de electroforeză tip „Labor", R.P.U.

2. *Cuva* sau camera umedă este construită din material plastic și poate avea diferite forme și diferite mărimi, după nevoile laboratorului. Cuva trebuie așezată pe o suprafață perfect orizontală. Capacul de închidere trebuie să fie etanș pentru a nu permite evaporarea soluțiilor tampon. Camera umedă este prevăzută cu două vase în care se pune soluția-tampon. Aceste vase sînt împărțite în 3 compartimente care comunică între ele. Compartimentele au șicane montate într-un sistem de labirint cu rolul de a împiedica variațiile pH. În compartimentele exterioare sînt așezați electrozii. În compartimentele interioare se introduc capetele benzilor de hîrtie de filtru așezate pentru migrare. Benzile de hîrtie de filtru sînt perfect întinse pe o ramă fixă sau mobilă a camerei umede. Cele două vase sînt prevăzute cu două orificii prin care pătrunde sifonul care menține la același nivel soluțiile tampon din ambele vase. În timpul migrării sifonul trebuie să fie închis.

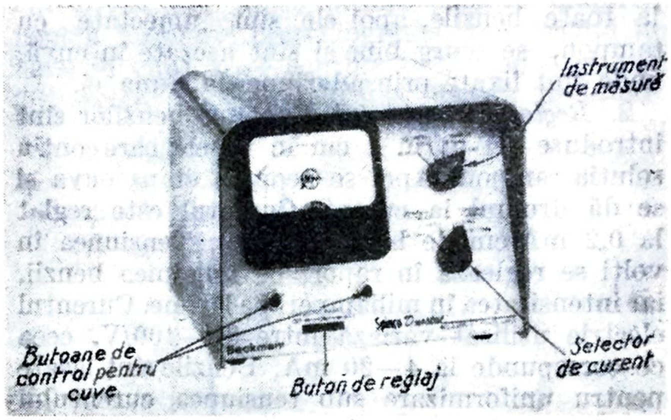


Fig. 19. — Redresor pentru electroforeză tip Beckman.

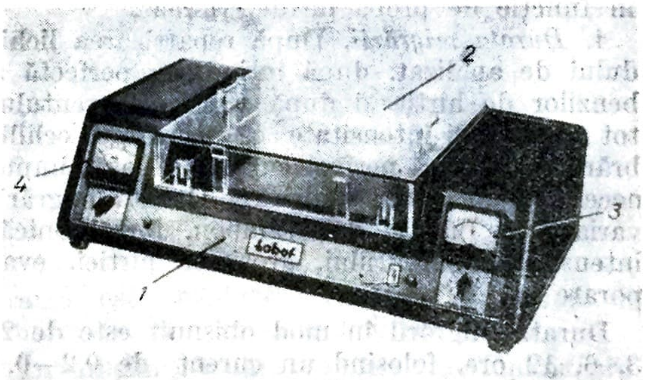


Fig. 20. — Aparat de electroforeză tip Labor (R.P.U.).
1 – redresor ; 2 – cuvă orizontală de material plastic ; 3 și 4 – cadrane pentru voltaj și amperaj.

3. *Electrozii*. Electrozii sînt confecționați din fire sau plăci de platină, nichel sau cărbune. Cei mai întrebuințați sînt electrozii de platină. În cazul electrozilor de cărbune se impune separarea lor de banda de hîrtie prin membrane poroase sau saci de celofan.

E. *Tehnica electroforezei:*

1. *Pregătirea cuvelor* şi a *benzilor de hîrtie.* Cele două vase din camera umedă sînt umplute cu soluţie-tampon şi aduse la acelaşi nivel. Benzile de hîrtie de filtru se pregătesc astfel: la o distanţă de 8 cm de capătul benzii se trage o linie transversală, distanţă care se respectă la toate benzile, apoi ele sînt umectate cu tampon, se scurg bine şi sînt aşezate în cuvă, unde sînt fixate prin adeziune de rama ei.

2. *Reglarea curentului.* Capetele benzilor sînt introduse cel puţin 1 cm în vasele care conţin soluţia tampon. Apoi se acoperă etanş cuva şi se dă drumul la curent. Curentul este reglat la 0,2 mA/cm de hîrtie (lăţime). Tensiunea în volţi se reglează în raport cu lungimea benzii, iar intensitatea în miliamperi pe lăţime. Curentul electric utilizat variază între 80—400/V, ceea ce corespunde la 4—20 mA. Benzile sînt lăsate pentru uniformizare sub tensiunea curentului o jumătate de oră, apoi se opreşte curentul şi se aplică lichidul de cercetat.

3. *Aplicarea lichidului de cercetat.* Se aplică lichidul de cercetat pe linia trasată la 8 cm de capătul benzii. Banda este aşezată cu acest capăt la catod (—). Aplicarea lichidului de cercetat se face la catod cu o micropipetă şi cu o repartiţie cît mai uniformă pe hîrtia de filtru printr-o mişcare pendulară. Cantitatea de lichid variază de la 0,005 la 0,03 ml; cantitatea este în funcţie de proba de determinat.

4. *Durata migrării.* După repartizarea lichidului de analizat, după întinderea perfectă a benzilor de hîrtie şi după reglarea curentului tot cu aceeaşi intensitate ca în timpul echilibrării se acoperă perfect cuva şi se lasă timpul necesar fixat pentru migrare. Durata migrării variază în funcţie de: tampon, forţa ionică, intensitatea curentului, grosimea hîrtiei, evaporare etc.

Durata migrării în mod obişnuit este de 2, 3, 6, 12 ore, folosind un curent de 0,2—0,4 mA/cm. În cazuri speciale durata se reduce la 10—15 minute folosind un cîmp electric de 44 mA/cm. În aceste condiţii trebuie să se scadă temperatura la + 4°.

5. *Uscarea* benzilor trebuie făcută cu multă atenţie, deoarece obţinerea fracţiunilor perfect conturate este în funcţie de această etapă. Benzile scoase din camera umedă trebuie expuse pe un cadran timp de o jumătate de oră la temperatura camerei. Apoi sînt ţinute în cuptorul electric la 100°, timp de 30 de minute. Scopul uscării la 100° este acela de a fixa proteina, aşa încît chiar dacă la temperatura camerei hîrtia s-a uscat, totuşi este necesar ca uscarea să fie făcută la etuvă. În cazul uscării benzilor direct în etuvă se produce o evaporare bruscă a lichidului şi totodată o deformare a soluţiilor proteice; de aceea nu trebuie să se treacă peste această etapă atît de importantă.

6. *Colorarea.* Electroforegrama fixată prin căldură, se introduce apoi în baia colorantă. Durata procesului de colorare depinde de colorantul folosit.

7. *Spălarea electroforegramei.* Pentru îndepărtarea excesului de colorant electroforegrama este trecută prin 3 băi de spălare specifice colorantului întrebuinţat. Soluţia 3% acid acetic este lichidul de spălare întrebuinţat aproape la toţi coloranţii.

8. *Uscarea electroforegramei.* Această operaţie se face în 10—20′, deoarece benzile de hîrtie după spălare sînt aşezate între două hîrtii de filtru pentru îndepărtarea excesului de lichid şi astfel timpul de 10—20′ este suficient.

9. *Evaluarea electroforegramei.*

Pentru evaluarea fracţiunilor separate prin migrare se folosesc două procedee:

Procedeul direct, care constă în trecerea benzii de hîrtie colorată şi transparentizată prin faţa unei fante luminate a unui sistem adaptat la fotometru. Sursa luminoasă trebuie să fie cît mai puternică. Lumina ce străbate banda de hîrtie în timpul înregistrării pierde din intensitate, datorită absorbţiei colorantului ce formează spoturile corespunzătoare fracţiunilor. Transparentizarea hîrtiei de filtru se obţine introducînd hîrtie de filtru după colorare într-un amestec format din 2 volume *α-bromnaftalenă + 1 volum ulei de parafină.* Imbibiţia cea mai bună se obţine în vid, iar în lipsa vidului, benzile vor sta peste noapte în lichidul de imbibiţie. Înregistrările efectuate pe hîrtia transparentizată duc la formarea curbelor Gauss.

Procedeul prin eluţie constă în decuparea spoturilor colorate, eluţia acestor spoturi şi apoi colorimetrarea sau fotocolorimetria eluatului.

Eluarea spoturilor se face în soluţii alcaline. Spoturile separate sînt tăiate mărunt cu foarfeca şi introduse în tuburi numerotate. Fiecare fracţiune se eluează în 3 ml din următoarele solvente: carbonat de sodiu 4%, metanol 50%. Tuburile sînt astupate cu dopuri, pentru a evita evaporarea şi deci concentrarea în timpul eluţiei care este de 1—2 ore la temperatura laboratorului. Probele eluate se citesc la fotocolorimetru pe scara de extincție cu cuve de 1 cm sau la colorimetru față de o probă martor.

Fotometrarea fracțiunilor eluate se face la fotometrul Pulfrich, folosind cuvele de 1 cm și filtrul de 550—600 mμ pentru albastru de bromfenol. Citirea se face pe scara de extincție a fiecărei fracțiuni proteice, iar suma extincțiilor citite se egalează cu 100, calculîndu-se apoi prin regula de trei simplă cît reprezintă procentual fiecare fracțiune a serului de analizat.

Metoda evaluării prin eluție are avantajul de a putea fi practicată în laboratoare mai puțin utilate, citirea făcîndu-se la fotometrul Pulfrich. Pentru trasarea curbelor, în metoda evaluării prin transparență este necesară o instalație specială, ca la aparatele tip Jouan și Beckmann.

Electroforeza proteinelor

Reactivi :

1. Soluție-tampon. Prepararea soluțiilor-tampon întrebuințate în electroforeza proteinelor sînt descrise mai înainte. Tampon veronal pH 8,6 f.i. 0,05 sau 0,075 sînt cele mai întrebuințate tampoane în electroforeza proteinelor.

2. Coloranți :

a)	albastru de bromfenol	0,1 g;
	sulfat de zinc	50 g;
	acid acetic glacial	50 ml;
	apă distilată	1 000 ml;
b)	azocarmin B	1 g;
	acid acetic glacial	28,2 ml;
	acetat de sodiu	3,69 g;
	glicerină	100 ml;
	apă distilată	1 000 ml;
c)	amidoschwartz 10 B	1 g;
	alcool metilic	900 ml;
	acid acetic glacial	100 ml;
d)	naftalen negru 12 B_{200}	1 g;
	acid acetic 10%	1 000 ml;
e)	verde Geigy	1 g;
	acid acetic 1%	1 000 ml.

Tehnica. Benzile de hîrtie sînt aranjate în cuva aparatului după ce au fost umectate în soluția-tampon pH 8,6 f.i. 0,05. Se fixează tensiunea necesară și se lasă timp de 30 de minute aparatul în funcțiune, apoi se aplică lichidul de cercetat. Pentru proteinogramă cantitatea de ser întrebuințată este de 0,005—0,01 ml. Serul trebuie să fie clar și nehemolizat.

Durata de migrare variază între 3 și 12 ore. Proteinograma este apoi uscată și colorată cu albastru de bromfenol 0,1‰.

Se folosesc în cazuri anumite, soluții cu cantități variabile de la 0,01 la 0,25 g albastru de bromfenol ‰.

Timpul de colorare a benzilor de hîrtie în soluția colorantă albastru de bromfenol variază după concentrația colorantului de la 10 minute la 16 ore. Pentru soluția de 0,1 g ‰ timpul de 3 ore este suficient. Excesul de colorant se înlătură trecînd proteinograma în 3 băi de acid acetic 2%. În primele două băi se ține cîte 5 minute, iar în ultima baie 10 minute; pentru 2 minute proteinograma este trecută în baia de viraj, care conține 10% acid acetic și 2% acetat de sodiu. După uscare proteinograma este evaluată, fie prin procedeul de eluare, fie prin procedeul direct.

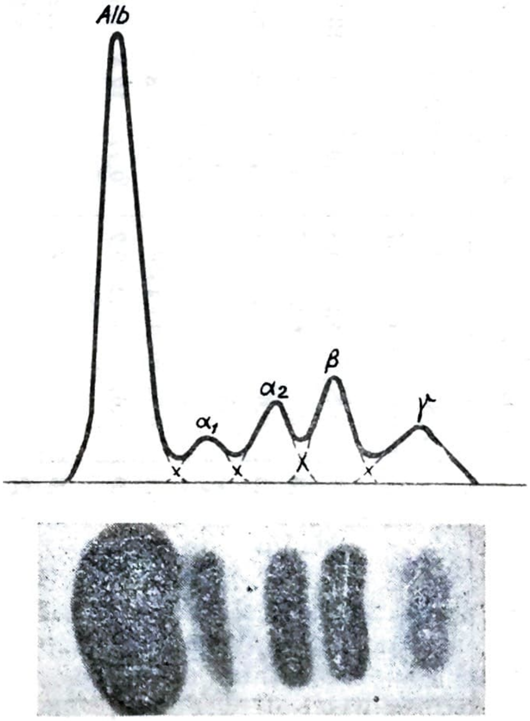


Fig. 21. — Reprezentarea grafică a unei proteinograme.

În tabelul 18 dăm valorile fracțiunilor proteice prin cele două procedee, eluare și transparentizare, după diferiți autori din literatură.

Analiza electroforetică a serului uman a dus, în ultimii ani, la descoperirea perturbărilor cantitative și calitative a proteinelor sanguine în cursul diferitelor boli.

La început aplicarea electroforezei a dat indicații numai asupra studiului proteinelor. Succesul în acest domeniu a făcut să se întindă utilizarea metodei și în studiul lipo- și glucoproteinelor.

TABELUL 18

Autorii	Metoda	Colorantul	Albumină			α_1 – globulină			α_2 – globulină			β – globulină			γ – globulină		
		Amidoschwartz	%	E.S.*	E.S.%**	%	E.S.	E.S. %	%	E.S.	E.S. %	%	E.S.	E.S. %	%	E.S.	E.S. %
Schwartzkopf	Eluare	,,	66,6	±3,3	±5	3,3	±0,6	± 18	5,7	± 0,7	±13	8,5	± 1	±12	15,6	± 1,6	±10,5
Pezold şi Kofes	Transparentizare	,,	46,7	2,0	4,3	5,8	0,7	12	9,8	0,9	9	13,2	0,7	5	24,8	2	8
	E	,,	55,7	4	7	3,3	2	60,6	8,7	2	23,0	10	3	30	21	7	33,3
	Tr	,,	64	2	3,1	3,3	0,6	6,9	8,7	0,6	6,9	8,7	1,2	13,8	15	1	66
Dittmer	E	,,		1,2			0,5			0,5			0,7			1,2	
	Tr	,,		1,6			0,6			0,8			1			1,4	
Owen	E	,,	66,9	1,75	2,6	4,4	0,52	11,48	6,9	0,55	8	9,2	0,78	8,5	12,8	1,21	9,5
	Tr	,,	66,6	2,53	3,8	3,9	0,67	17,2	6,2	0,77	12,4	7,6	0,88	11,6	15,6	2,11	13,5
Comoroşan şi Mitrică	E	Albastru de bromfenol	62			3,8			7			9,2			18		
	Tr	,,	65			4,2			6,2			8,1			18,9		

*ES = Eroare standard în valori absolute.

**ES% = Eroare standard, exprimată la sută, față de valoarea dată.

Electroforeza lipoproteinelor

***Reactivi*:**

1. Soluţiile tampon sînt aceleaşi ca şi pentru electroforeza proteinelor.
2. Coloranţi :

a) Sudan negru B	0,1 g;
alcool 60°	100 ml.

La 100 ml alcool 60° se adaugă 0,1 g colorant Sudan negru B. După ce colorantul a fost pus în suspensie prin agitare puternică, se fierbe o oră în balon cu refrigerent. După răcire se filtrează prin hîrtie Whatman nr. 1, se completează cu alcool de 60° la 100 ml şi se păstrează în sticle cu dop rodat la întuneric. Excesul de colorant se spală cu alcool 60°.

b) Sudan III	1 g;
alcool 75°	900 ml;
acetonă	100 ml.

Amestecul se fierbe o oră în baie Marie cu refrigerent la fel ca şi colorantul Sudan negru B. Excesul de colorant se spală cu alcool 60°.

c) Roşu de ulei (oil red 0)	0,8 g;
alcool 60°	500 ml;
alcool izopropilic	25 ml.

Soluţia colorantă se prepară ca şi cele de mai sus. Excesul de colorant se spală cu apă de robinet.

Tehnica : lipidele se găsesc în serul sanguin în proporţii de 0,6–0,7% deci de 10 ori mai puţin faţă de cantitatea de proteine. Cantitatea de ser aplicată pentru lipidogramă este de 7–10 ori mai mare decît pentru proteinograme.

Condiţiile de lucru pentru separarea fracţiunilor lipoproteice sînt identice cu cele pentru separarea proteinelor.

Timpul de colorare a lipidogramelor variază după colorant. Pentru Sudan negru B, timpul de 3 ore este suficient, iar îndepărtarea excesului de colorant se face cu alcool 50%.

În acest scop se prepară 3 băi cu alcool 60%, iar lipidograma este ţinută cîte 15 minute în fiecare baie. Lipidograma se usucă identic ca şi proteinograma. Lipidograma prezintă benzi colorate în regiunea fracţiunilor β- şi α- globulinelor.

O altă metodă de a pune în evidenţă lipoproteinele constă în aplicarea serului colorat pe hîrtie. Colorarea serului se face cu Sudan negru B, Sudan III sau IV; în acest caz lipoproteinele pot fi observate o dată cu migrarea.

Citirea prin transparenţă, procedeu folosit la proteine, este greu de aplicat în cazul lipidelor, deoarece amestecul de α-bromnaftalină şi ulei de parafină dizolvă parţial grăsimile, scade intensitatea culorii, iar rezultatele sînt eronate.

Evaluarea benzilor se face prin eluţie tăind banda în fîşii mici şi extrăgînd culoarea cu amestec de *alcool etilic* + 20% *acid acetic* v/v. Citirea rezultatelor se face fotocolorimetric cu filtru S_{590}. Se disting între 4 şi 6 fracţiuni lipoproteice, dintre care numai două sînt principale, prima, cu vîrful situat între albumine şi α-globuline, conţine 10—25% din colesterolul seric şi fosforul lipidic (fig.22). Al doilea spot are vîrful situat între β- şi γ-globuline, se întinde mai ales în regiunea β-globulinelor. Spotul este format din lipoproteine ce migrează foarte încet. Pentru a determina poziţia fracţiunilor lipoproteice, este necesară efectuarea în paralel a unei electroproteinograme.

Dăm în tabelul 19 valorile normale ale fracţiunilor lipidice obţinute prin electroforeză pe hîrtie de diferiţi autori.

TABELUL 19

Lipidograma

Autori	Colorant	α (%)	β(%)
G. Biserte	Sudan negru	22	52
R. Joyeuse	,, ,,	25	74
F. Franken	,, ,,	20	80
W. Haag	,, ,,	27,3	72,7
A. Nijs	,, ,,	23,8	70,3
G. Ricci	,, ,,		
G. Schettler	,, ,,	20	80
R. Wieme	,, ,,	25—30	45—50
E. Sohar	Roşu de ulei	35,3	52,4
S. Comoroşan şi N. Mitrică	Sudan negru	28,5	56—58

Glicoproteinele

Reactivi :

1. Soluţia oxidantă : se dizolvă în 270 ml apă distilată 7,2 g acid periodic, 2,5 g acetat de sodiu cu 3 H_2O. După dizolvare se adaugă 600 ml alcool absolut. Reactivul se utilizează proaspăt.

2. 15 g iodură de potasiu, 15 g tiosulfat de sodiu sînt dizolvate în 300 ml apă distilată.

3. Reactivul Schiff. 1,5 g fucsină acidă Geigy se dizolvă în 500 ml apă distilată fierbinte. Se filtrează prin hîrtie Whatman la 55°. Soluţiei răcite la 40° i se adaugă 25 ml ClH 2N şi 3,75 g metabisulfit de sodiu. Se agită pentru dizolvare rapidă. Se completează la 500 ml apă distilată. Se păstrează 16 ore la gheţar în flacon brun. Se adaugă apoi 2,5 g cărbune activ Merck şi se lasă în contact timp de 10 minute. Se filtrează rapid (2—3 minute) prin hîrtie Whatman sau altă hîrtie bună de filtru. Conţinutul în fucsină este de 300 mg% şi aciditatea de 0,1 N ClH.

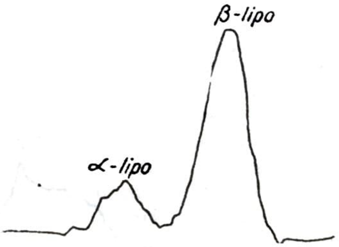


Fig. 22. — Reprezentarea grafică a lipidogramei.

4. 6,85 g metabisulfit de sodiu (pirosulfit) sau 8 g metabisulfit de potasiu sînt dizolvate în 100 ml apă distilată la care se adaugă 10 ml ClH concentrat.

5. Se amestecă 300 ml din soluţia 2 cu 450 ml alcool absolut. Se adaugă încet 7,5 ml ClH 2N.

6. Alcool 70%.

7. Hidrat de sodiu N.

Tehnica. Glicoproteinele se găsesc în cantităţi mult mai mici faţă de proteine, de aceea se lucrează cu o cantitate de ser de 2—3 ori mai mare. Condiţiile de lucru pentru separarea fracţiunilor glicoproteice sînt identice cu cele pentru separarea proteinelor :

1. După migrare electroforegrama este uscată mai întîi la temperatura laboratorului şi apoi la 110°, timp de 10—20 minute.

2. Banda de hîrtie uscată este trecută în alcool pentru 10 minute şi apoi lăsată 8 minute în soluţia de acid periodic (reactiv 1).

3. Se spală timp de 2 minute în alcool 70° (reactiv 6) şi apoi se trece pentru 7—8 minute în soluţie reducătoare (reactiv 5).

4. Se spală rapid în alcool 70° (reactiv 6) pentru îndepărtarea urmelor de acid periodic, apoi se aşază electroforegrama între două hîrtii de filtru pentru îndepărtarea lichidului în exces.

5. Cînd electroforegrama nu mai conţine lichid în exces este trecută în soluţia de fucsină bazică, adică în reactivul Schiff (reactiv 3)

pentru 25—40 de minute, timp în care se dezvoltă maximum de culoare.

6. Electroforegrama se spală de 5 ori cîte 3 minute în soluția de metabisulfit (reactiv 4), se tratează 2 secunde cu alcool (reactiv 6), se usucă la temperatura camerei, la întuneric, peste noapte.

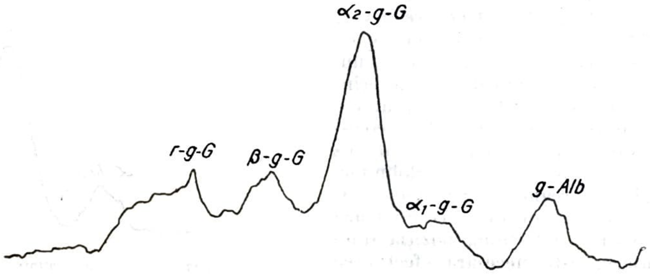


Fig. 23. — Reprezentarea grafică a gucidogramei.

7. Evaluarea prin eluare. Hîrtia se taie în fragmente mici și se trece în tuburi de centrifugă; fiecare tub conține 5 ml hidrat de sodiu N. Se astupă tuburile cu dopuri de plută și se lasă la 70°, timp de 2 ore, se adaugă în fiecare tub 5 ml alcool absolut, se răcesc și li se mai adaugă 1 ml de acid acetic glacial. Lichidul se centrifughează și se fotocolorimetrează cu filtrul 550 mμ sau se colorimetrează față de eluatul obținut din fondul electroforegramei.

Calculul. Se scade extincția martor, se face suma și se calculează compoziția procentuală a fracțiunilor respective.

La serul normal fracțiunile glicoproteice sînt în număr de 5, se găsesc în concentrație mare între globulinele α_1, α_2, complex glicolipidoproteic, iar în β și γ concentrațiile sînt mici.

Dăm în fig. 23 diagrama unei glucidograme normale.

Dăm în tabelul 20 valorile normale ale fracțiunilor glucidice obținute de diferiți autori prin electroforeză pe hîrtie.

MICROELECTROFOREZA ÎN GEL

Microelectroforeza în gel are aplicare importantă, atît în studiul proteinelor, lipidelor și glucidelor, cît și în analizele imunologice de mare precizie. Determinarea cantitativă a electroforegramei, efectuată în gel pe lame de sticlă, necesită un dispozitiv special de înregistrare fotoelectrică. Gelul se poate turna pe diferite suporturi și poate fi tăiat și eluat ca și în cazul electroforezei pe hîrtie de filtru Whatman.

Se va descrie în detaliu metoda electroforezei în gel pe diferite suporturi.

TABELUL 20

Glucidograma

Autori	Albumina	Globuline			
		α_1	α_2	β	γ
Raynaud	3,5	10,70	28,60	28,60	28,60
Biserte și Guerin	4,3	20,5	33,8	25,8	16
Andreani	15,2	7,5	29,4	30,5	17,4
Hirsch-Marie	10,89	19,89	26,1	26,1	26,1
Romani	10,89	10,89	26,1	26,1	26
Björnesjö	13,1	17,9	27,9	23,8	17,2
Sonnet J.	12,6	20,4	26,5	23	17,5
S. Comoroșan și N. Mitrică	13	12	29,5	21,8	15—16

Metoda și materialul necesar pentru electroforeza proteinelor în gel

Prepararea gelozei. Geloza este așezată în saci de tifon și pusă la dializă într-un vas de sticlă, în care trece un curent de apă de robinet. După 3 zile, sacii sînt trecuți în apă distilată pentru 48 de ore. Geloza spălată prin dializă se usucă apoi la 80° și se păstrează în borcane la temperatura laboratorului. Din această geloză se prepară la fierbere o soluție 1% în tampon veronal, care se filtrează prin vată. Se repartizează în tuburi cca. 10—15 ml și se păstrează în stare gelificată la +4°. În momentul folosirii se topește geloza în baie de apă.

Tampon veronal:
10 g veronal sodic;
1,7 g veronal acid;
0,1 g merthiolat (conservant);
1 000 ml apă distilată.

Turnarea gelozei pe lame de sticlă sau pe diferite suporturi. Gelul de agar este turnat cald pe lame de sticlă, pe suport de film radiologic sau hîrtie, în felul următor: pe lame de microscop sau lame de sticlă ordinară 3/16 cm sau orice altă dimensiune, așezate perfect orizontal, se așterne filmul sau hîrtia, tăiate exact după dimensiunile suportului de sticlă. Hîrtia sau filmul sînt umezite în prealabil în soluție-tampon pentru a adera perfect la suportul de sticlă. Se toarnă geloza avînd grijă ca în timpul operației să se mențină la temperatura de 70—80°. Cantitatea de geloză folosită este 0,125 ml/1 cm^2 de suport. Se toarnă cu o pipetă pe mijloc și cu o baghetă de sticlă se întinde geloza spre marginea lamei, astfel încît întreaga suprafață să fie uniform acoperită. Lamele se acoperă cu capace de sticlă și se lasă între 30 de minute și o oră pentru a se gelifica.

Prepararea suporturilor de film. Se întrebuințează filme de radiologie albe sau galbene, care s-au curățat lăsîndu-le cîteva ore în apă rece pentru hidratarea gelatinei. În acest mod gelatina se îndepărtează ușor, filmele se păstrează la loc uscat pînă la folosire.

Prepararea suporturilor de hîrtie. Hîrtiile folosite sînt următoarele: hîrtie albă velină, semivelină, carton alb, hîrtie milimetrică, celofan și hîrtie de filtru ordinară. Toate aceste suporturi dau rezultate similare. După ce gelificarea pe film sau hîrtie a avut loc, se transportă lamele cu totul în cuva de electroforeză. Aici sînt două rezervoare umplute cu același tampon veronal care a servit la prepararea gelului de agar și care, în prealabil, a fost echilibrat printr-un sistem de tuburi comunicante. La extremitățile lamelor se aplică două hîrtii de filtru care sînt îndoite la un capăt, astfel încît să acopere exact jumătate de cm din lățimea lamei de gel, iar celălalt capăt se scufundă în rezervorul de tampon în care sînt cufundați, în partea opusă, electrozii de platină.

Pe hîrtia de filtru care servește ca suport se trage exact la mijloc o mică linie cu creionul. Se marchează la unul din capetele hîrtiei numărul serului, data etc. Pe filme nu se poate marca nimic în prealabil. Se scrie însă pe dosul suportului de sticlă. La sfîrșitul electroforezei, după colorare și uscare, se pot scrie cu cerneală datele necesare pe filmul lucrat.

Aplicarea spotului de ser se face astfel: se taie hîrtie de filtru de $1-1^1/_2$ cm lungime și 0,1—0,2 cm lățime. Se îmbibă în proba de analizat și se aplică cu o pensă fină exact pe linia centrală trasată pe hîrtie. Întreg sistemul este acoperit cu un clopot de sticlă înlocuit ulterior cu o cuvă, confecționată din plexiglas, care poate fi închisă mai mult sau mai puțin ermetic; polii sînt legați prin fire electrice cu redresorul, iar curentul electric poate fi astfel reglat încît să dea 0,8—1 mA/cm de lățime a plăcilor cu gel de agar. Durata migrării depinde de forța ionică, pH, lungimea lamelor, mărimea spotului de ser și de natura hîrtiei folosite ca suport al gelului. În general, pentru lamele de 16 cm lungime, migrarea se face în 6—8 ore pentru proteine. Migrarea trebuie oprită, cînd albuminele au ajuns la maximum 2 cm de capătul lamei mari și la 1 cm de cel al lamelor de microscop, migrarea albuminelor fiind vizibilă datorită colorării serului cu cîteva granule de bromfenol.

Fixarea lamelor. După întreruperea curentului, punțile de hîrtie de filtru sînt înlăturate și lama de sticlă împreună cu hîrtia sau filmul cu gel sînt trecute în soluția fixator care conține: alcool 60° în acid acetic glacial 2%. Durata de fixare este minimum 3 ore; se pot însă lăsa lamele 24 de ore. Se recomandă numai în cazul folosirii suportului de film, iar durata să nu depășească 3 ore.

Uscarea plăcilor. Pentru reușita operației, timpul acesta este foarte important. Se scoate filmul sau hîrtia cu gel și se așază pe o placă de sticlă mare pe care s-a așternut o bucată de hîrtie de filtru. Pe suprafața gelului se întinde o fișie tot de hîrtie de filtru, astfel încît să adere perfect la gel. Pe deasupra ei se pun bucăți de hîrtie de filtru, tăiate în pătrate mici. Totul se acoperă cu o placă de sticlă. Cînd hîrtiile mici s-au umezit, se schimbă. Această operație este necesară pentru o uscare omogenă și pentru a absorbi excesul de săruri din gel, care altfel ar cristaliza la suprafața gelului în timpul uscării la 100°.

Colorarea filmului de gel. Lama uscată este apoi introdusă timp de 8—10 ore în baia de colorant după natura probei de analizat. Formula colorantului pentru proteine este următoarea: 0,1 g albastru de bromfenol, 50 g sulfat de zinc, 50 g acid acetic glacial în 1 000 ml apă distilată.

Spălarea filmelor sau hîrtiilor cu gel. Excesul de colorant se înlătură trecînd electroforeza în băi de acid acetic 2%, 5 minute în primele două băi, iar în ultima 10 minute. Baia de viraj conține 10% acid acetic, 2% acetat de sodiu. În această baie filmele stau 2 minute.

Uscarea. Din baia de viraj, electroforegrama se așază între două hîrtii de filtru curate pentru îndepărtarea excesului de lichid și apoi se pun pe o placă de sticlă între 2 hîrtii de filtru uscate, se lasă la 70–100° pînă la uscare completă. După uscare, spoturile fracțiunilor proteice sînt colorate în albastru.

Eluare. Spoturile separate sînt tăiate mărunt cu foarfeca și apoi sînt eluate întocmai ca la electroforeza pe hîrtie de filtru. După introducerea în tuburile numerotate, se eluează fiecare fracțiune în 3 ml din următoarele solvente: carbonat de sodiu 4%, metanol 50%. Se astupă tuburile cu dopuri și se lasă o oră în repaus, agitînd din cînd în cînd.

Fotometrarea se face identic ca la electroforeza pe hîrtie.

Pentru determinarea lipoproteinelor și a glicoproteinelor în gel se aplică aceeași metodă ca pentru determinarea proteinelor în gel, pînă la etapa de colorare. Trebuie însă să se țină seama de faptul că, atît lipo-, cît și glicoproteinele se găsesc în ser în cantități mult mai mici decît proteinele. De aceea pentru determinarea acestor fracțiuni se lucrează pe cantități de 10–15 ori mai mari decît în cazul proteinelor.

Metoda și materialul necesar pentru electroforeza glicoproteinelor în gel

Reactivi :

1. Clorhidrat de hidroxilamină 10% în tampon acetat de sodiu acid acetic pH 4,7.

3. Acid periodic 1% în acetat de sodiu N/10.

5. Reactiv Schiff (identic ca la pag. 41 glicoproteine pe hîrtie).

6. Apă sulfuroasă: 50 ml metabisulfit de sodiu ($S_2O_5Na_2$) 10%+50 ml acid clorhidric 2N completat la 1 000 ml cu apă distilată.

7. Apă sulfuroasă glicerinată. 20% glicerină la apa sulfuroasă preparată ca la punctul 6.

Toți reactivii, în afară de reactivul Schiff, se prepară înainte de întrebuințare.

Colorare. După fixarea lamelor în alcool acid și uscarea lor la 105° se aplică schema următoare:

a) Clorhidrat de hidroxilamină	15 minute;
b) Spălare cu apă curentă .	15 minute;
c) Acid periodic	10 minute;
d) Spălarea lamelor cu apă de robinet	10 minute;
e) Reactiv Schiff (diluat $^1/_2$ cu apă distilată înainte de întrebuințare)	3 minute;
f) 3 spălări succesive în apă sulfuroasă	2 minute fiecare spălare;
g) 3 spălări succesive în apă sulfuroasă și glicerinată	1 oră fiecare spălare;
h) Uscarea plăcilor la etuvă.	

Evaluarea glicoproteinelor în gel se face ca la metoda glicoproteinelor pe hîrtie, fie prin procedeul direct, fie prin eluare.

Metoda și materialul necesar pentru electroforeza lipoproteinelor în gel. După fixarea lamelor în alcool-acid și după uscare, dacă serul nu a fost colorat inițial se introduce placa în în colorantul specific, negru Sudan B, după tehnica descrisă la determinarea lipidelor pe hîrtie.

Evaluarea fracțiunilor se poate face direct, prin transparență ceea ce — ca și în cazul lipidogramei pe hîrtie — prezintă unele dezavantaje sau prin eluare într-un amestec de alcool etilic + acid acetic 20% v/v.

Citirea rezultatelor se face fotocolorimetric cu filtrul 590 mμ.

IMUNOELECTROFOREZA

Metoda imunoelectroforezei se bazează pe fracționarea electroforetică în gel de agar a proteinelor din ser, cuplată cu difuzarea perpendiculară pe axul de migrare a serului antiproteină respectiv. Aceste linii pot indica fracțiunea în care este localizată funcția responsabilă de proprietățile specifice ale componentei desfășurate prin electroforeză.

Cele mai mici diferențe privind localizarea funcției specifice, cît și intensitatea și omogenitatea lor pot fi demonstrate prin poziția liniilor de precipitare, prin mărimea și numărul lor.

Analiza imunoelectroforetică efectuată cu seruri imune anti-om pune în evidență 15–35 constituenți proteici în serul normal. Acești constituenți au fost identificați prin reacțiile caracteristice de culoare și prin reacțiile imunochimice făcute cu seruri antispecifice obținute pe cal, capră sau pe iepure.

Figura 24 reprezintă schema unei imunoelectroforeze a serului normal de om cu 15 fracțiuni proteice, în următoarea clasificare:

1. *Prealbuminele* sînt fracțiuni cu viteza de migrare mai mare decît a albuminelor. Există una sau două prealbumine în serul normal de om, dar în cantitate atît de mică, încît în cele mai multe cazuri, nici nu poate fi pusă în evidență. Pe diagramă sînt notate cu P_1 și P_2.

2. *Albuminele* sînt reprezentate în imunoelectroforeză prin cea mai groasă linie de precipitare. Prin hidroliză enzimatică s-au pus în evidență 3 determinanți antigenici cu mobilitate electroforetică diferită. O caracteristică a albuminelor este, de asemenea, viteza de apariție în procesul de precipitare. Albuminele apar în primele ore ale reacției antigen-anticorp și se intensifică în timp mai mult decît celelalte linii de precipitare.

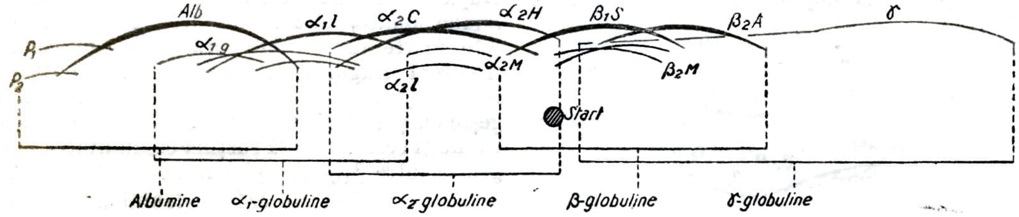


Fig. 24. — Diagrama imunelectroforetică a serului uman normal.

P_1 – prealbumină; P_2 – lipoalbumină; *Alb*-albumină; $\alpha_1 g$— α_1— glicoproteină; $\alpha_1 l$ – α_1—lipoproteină; $\alpha_2 C$— α_2— ceruloplasmină; $\alpha_2 l$—α_2—lipoproteină; $\alpha_2 H$— α_2— haptoglobină; $\alpha_2 M$ – α_2—macroglobulină; $\beta_1 S$—β_1— siderofilină; $\beta_2 A$ – β_2— anticorpi; $\beta_2 M$ – β_2— macroglobulină; γ – γ— globulină.

3. α-*globulinele* dau linii de precipitare foarte fine și sînt divizate în α_1- și α_2-globuline.

α_1-globulinele sînt fracțiuni cu viteze de migrare foarte apropiate de a albuminelor. Ele nu pot fi studiate decît după absorbția anticorpilor antialbumină.

α_2-globulinele sînt fracțiuni cu viteză mai lentă decît α_1-globulinele.

În mod curent se observă două linii de precipitare în zona α_1-globulinelor, una dată de o fracțiune cu caracter glicoproteic, alta cu caracter lipoproteic. În cazurile patologice numărul liniilor se multiplică.

Serurile anti-om cu titru ridicat au putut pune în evidență, în zona α_2-globulinelor, 10 fracțiuni care diferă unele de altele prin mobilitate electroforetică, cît și prin comportamentul imunochimic. Printre principalele α_2-globuline se numără haptoglobina, ceruloplasmina, α_2-macroglobulina și o lipoproteină.

a) *Haptoglobina* este o glicoproteină care se caracterizează printr-o linie fină de precipitare. Adăugarea hemoglobinei la un ser înainte de electroforeză duce la o diminuare a mobilității hemoglobinei. Complexul haptoglobină-hemoglobină migrează cu o viteză între haptoglobină și hemoglobină care are o mobilitate de β_1-globulină.

b) *Ceruloplasmina* dă o linie de precipitare destul de slabă, situată între haptoglobină și α_2-macroglobulină; este o cupruproteină cu activitate oxidazică. Ea conține o cantitate mare de cupru seric.

Cantitatea mare de cupru și activitatea oxidazică — proprietăți bine definite ale ceruloplasminei — au fost întrebuințate de Uriel, pentru a pune în evidență această proteină în analizele imunoelectroforetice, cît și în cele electroforetice. Purificarea acestei proteine duce la o denaturare care îi modifică mobilitatea electroforetică, activitatea imunochimică și enzimatică.

c) α_2-*globulina* sau macroglobulina lui Schultze dă o linie de precipitare foarte curbată și departe de rezervorul cu anticorpi. Această proteină este o glicoproteină cu constanta de sedimentare de S_{20} și reprezintă 2% din proteinele totale serice.

d) α_2-*lipoproteina* numită și lipoeuglobulină corespunde, din punct de vedere electroforetic, lipoproteinelor lente.

4. β-*globulinele* sînt divizate în β_1- și β_2-globuline.

a) În zona β_1 s-au pus în evidență 3 fracțiuni bine identificate. Una dintre ele este siderofilina sau transferina care transportă fierul seric, iar celelalte două sînt β_{1A}- și β_{1B}-globuline.

Siderofilina, care este fracțiunea cea mai lentă din grupul β_1-globulinelor, prezintă un arc de precipitare foarte apropiat de rezervorul de anticorpi. Siderofilina a putut fi purificată prin fracționare cu alcool, stabilindu-se astfel constantele chimice și natura antigenică.

Globulinele β_{1A} și β_{1B} diferă numai prin viteza de migrare, ele avînd același caracter de euglobine. Forma liniilor de precipitare a acestor fracţiuni β este mult schimbată la serurile vechi sau încălzite timp de 30 de minute la 56°, comparativ cu un ser normal.

b) În zona β_2 s-au pus în evidenţă 3 fracţiuni globulinice β_{2A} β_{2B} şi β_{2M}, care se disting unele de altele prin mobilitate electroforetică şi prin comportamentul imunochimic. Mobilitatea lor interferă cu a γ-globulinelor rapide. Ele se găsesc ca impurităţi în preparatele de γ-globuline purificate. Din această cauză au fost numite şi γ_1-globuline. Pentru un studiu al β_2-globulinelor este necesară folosirea unui ser imun anti-om absorbit cu γ-globulină, deoarece linia de precipitar ea γ-globulinelor împiedică şi, totodată, maschează liniile de precipitare a β_2-globulinelor.

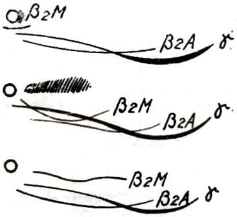


Fig. 25. — Poziţia şi forma globulinei β_2M.

β_{2A}-globulinele dau o linie de precipitare aproape dreaptă, care este de foarte multe ori acoperită de linia γ-globulinei. Ele reprezintă fracţiunea β-globulinică cea mai frecventă în ser şi care se poate descoperi destul de uşor. Această fracţiune a fost izolată de Heremans, iar constantele sale fizico-chimice sînt cunoscute.

β_{2A}-globulina este o proteină purtătoare de anticorpi şi în cazurile patologice poate suferi mari variaţii cantitative.

β_{2B}-globulina prezintă un arc de precipitare paralel cu β_{2A}, dar mult mai întins de la rezervorul de plecare. Acest constituent este foarte crescut în cazuri patologice, iar în cazurile normale se întîlneşte destul de frecvent.

β_{2M}-globulina este o proteină cu greutate moleculară de un milion şi cu constanta de sedimentare S_{20}; se găseşte în cantităţi infim de mici în serul normal de om. În imunoelectroforegramă linia de precipitare are o formă particulară, în cele mai multe cazuri prezentînd un arc de precipitare cu dublă curbură; alte ori dă o precipitare localizată în godeul de plecare al electroforegramei sau în afara godeului. În figura (25) sînt reprezentate diferitele forme ale acestei fracţiuni.

Deutsch a reuşit, prin tratarea acestei macroglobuline cu cisteină sau mercaptoetanol, scindarea în fragmente mici cu constanta de sedimentare S_6 şi greutatea moleculară de 160 000. După depolimerizare îşi păstrează proprietăţile imunochimice, dar mobilitatea electroforetică este foarte mult schimbată. Prin imunoelectroforeză fragmentele depolimerizate dau 2 linii de precipitare, dintre care una se prelungeşte cu γ-globulina. Această observaţie a făcut ca mulţi cercetători să susţină comunitatea antigenică între β_{2M}- şi γ-globuline.

La imunoelectroforeză γ-globulina este reprezentată de o linie de precipitare care parcurge toată zona electroforetică a γ-globulinelor şi care traversează şi zona β, ajungînd în zona α_2. Această linie este foarte netă şi aproape dreaptă în porţiunea γ-globulinelor. Proteinele care dau această linie au toate aceeaşi structură antigenică. De aceea s-a zis că în zonele electroforetice β şi α_2 sînt proteine identice din punct de vedere imunologic cu γ-globulinele clasice. γ-globulinele au fost izolate în stare pură, determinîndu-se constanta de sedimentare egală cu S_{7-9} şi greutatea moleculară 160 000. Rolul fiziologic al γ-globulinelor este cel mai bine cunoscut, ele fiind suportul celor mai mulţi anticorpi.

Metoda Grabar şi Wiliams este una din metodele de imunoelectroforeză cel mai mult folosită în laboratoarele clinice.

Reactivi :

1. Tampon veronal pH 8,6 se obţine din 800 ml soluţie A, 200 ml soluţie B plus 0,1 g mertiolat de sodiu. Mertiolatul adăugat la soluţia-tampon face inutile măsurile de sterilizare în metoda imunoelectroforezei.

Soluţia A. Veronal sodic 20 g, dizolvate în 1 000 ml apă distilată.

Soluţia B. Acid clorhidric p. a. N/10.

În imunoelectroforeză se poate întrebuinţa oricare sistem tampon descris pentru electroforeză.

2. *Geloza* 2%. Spălarea, purificarea şi uscarea gelozei se fac la fel ca pentru microelectroforeza în gel. Din geloza astfel pregătită se face o soluţie de 2% în tampon veronal

pH 8,6, care se repartizează în tuburi și se păstrează în stare gelificată la 4°. În momentul folosirii se încălzește geloza în baia de apă la fierbere. Nu se recomandă ca același tub de geloză să fie încălzit de mai multe ori.

3. *Coloranții* folosiți în imunoelectroforeză sînt azocarmin B și amidoschwartz. Soluțiile colorante sînt preparate la fel ca pentru electroforeza pe hîrtie.

4. *Lichidele biologice* cercetate mai frecvent în laboratorul clinic sînt: ser, urină, suc gastric, lichid cefalorahidian, lichid pleural, lichid peritoneal.

5. *Imunoserul* folosit în imunoelectroforeză pentru lichidele biologice este o antiproteină umană normală, obținută pe iepure, capră și cal.

Serul anti-om, livrat de Institutul „Dr. I. Cantacuzino'', este obținut prin imunizarea caprelor cu antigenul globulinic al centrului de hematologie. Acest ser anti- cu titrul globulinic 1/200 000 și titru precipitant 1/100 pune în evidență, în prezența serului uman normal, 8 linii de precipitare, deoarece el conține numai fracțiunile sistemului globulinic.

Serul precipitant livrat tot de Institutul „Dr. I. Cantacuzino'' este obținut prin imunizarea cailor cu același antigen. Acest ser cu titrul globulinic 1/25 000 și titru precipitant 1/4 000 pune în evidență, în prezența serului uman normal, 24 de linii de precipitare. El conține, atît fracțiunile sistemului globulinic, cît și fracțiunile sistemului albuminic.

Tehnica. Geloza se poate turna pe lame de sticlă de orice dimensiuni; se folosesc lame de microscop sau lame de 4/24 cm, care sînt acoperite cu 0,2 ml geloză pe cm^3 de lamă. După gelificare, în mijlocul lamei și aproape de una din marginile laterale, se taie un godeu cu diametrul de 0,5 cm și se umple cu soluția care urmează să fie supusă electroforezei (respectiv antigenul). Lamele sînt așezate în aparatul de electroforeză sub un curent de 1 mA/cm lățime (adică 4 mA pe lamă). Durata migrării este în funcție de pH, forță ionică și lungimea lamelor. După desfășurarea electroforetică se taie la marginea superioară a lamei și la o distanță de 0,5 cm de capătul godeului din centru, un șanț care se umple cu antiser. Îndepărtarea gelului din șanț și godeu se face cu ajutorul unui bisturiu; se pune pe fundul șanțului puțină geloză topită, lăsîndu-se cîteva minute pentru gelificare, și apoi se introduce cu o pipetă componenta respectivă. Experiența se urmărește timp de 5–6 zile în camera umedă la temperatura camerei, timp în care liniile de precipitare se intensifică.

Uscarea și colorarea lamelor. Pentru îndepărtarea excesului de proteină care nu a intrat în reacție și care în timpul colorației fixează colorantul mascînd zonele de precipitare specifică, este necesar ca placa cu gel să fie spălată, timp de 24–48 de ore, într-o baie cu ser fiziologic care conține 0,1 g mertiolat ‰ soluție. În acest timp, soluția se schimbă de cîteva ori (4-5 ori). Operația de spălare se face cu atenție, întrucît gelul se desprinde de pe placa de sticlă. Apoi se absoarbe excesul de ser fiziologic cu hîrtie de filtru. Se completează șanțul cu geloză topită și se usucă la 37–80° cu o hîrtie de filtru aplicată pe suprafața gelului.

Lamele uscate se pot păstra ca atare sau se pot reîmbiba cu ser fiziologic, în care caz zonele de precipitare apar nemodificate; în sfîrșit, plăcile uscate se pot colora din stare uscată cu azocarmin B sau amidoschwartz. Placa este introdusă în colorant, timp de 2 ore, apoi se spală rapid cu apă de robinet, se tamponează cu hîrtie de filtru și se usucă la 37°. Plăcile uscate și colorate se pot păstra timp nelimitat.

Metoda imunoelectroforezei permite un studiu calitativ amănunțit al proteinelor serice cu ajutorul celor 35 de linii de precipitare, dar nu un studiu cantitativ. Metoda imunoelectroforetică este considerată ca o metodă calitativă și nu cantitativă.

Aplicarea acestei metode calitative în laboratorul clinic a dat rezultate precise în toate domeniile clinice și mai ales în hepatologie, nefrologie și hematologie.

În ciroze și hepatite virale, creșterea γ-globulinelor este asociată și cu o creștere a fracțiunilor globulinice β_{2A} și β_{2M}. S-a constatat un paralelism între pozitivitatea reacției timol și creșterea macroglobulinelor β_{2M}.

În unele forme grave de ciroză de ficat sau hepatite virale, metoda imunoelectroforetică permite constatarea dispariţiei unor componente globulinice ca α_2 şi β_1.

În sindroame nefrotice se constată o creştere a globulinelor; analiza imunoelectroforetică permite precizarea acestei creşteri, care se datoreşte următoarelor fracţiuni: α_2-macroglobulinei Shultze, α_2-lipoproteinei şi haptoglobinei.

Prin imunoelectroforeză mielomul multiplu se clasifică în γ-mielom, β_{2A}-mielom şi mielom de tip Bence-Jones.

În macroglobulinemia Waldenström imunoelectroforeza permite diferenţierea de mielom (vezi „Hematologia").

În tabelul 21 sînt date variaţiile fracţiunilor imunoelectroforetice în diferite boli.

TABELUL 21

Boala	Variaţia fracţiunilor imunoelectroforetice
Ciroze	— o creştere în ansamblu a γ-globulinelor (linia de precipitare mult mai lungă şi mai groasă ca la normal); — creşterea β_2 şi uneori pe lîngă acestea două şi creşterea β_2M; — scăderea liniei de precipitare a albuminelor; — în cirozele etilice decompensate apare, în plus o scădere accentuată a haptoglobulinelor, α-, α_2- şi β_1-globulinelor
Nefroze	— scăderea β_2- şi a γ-globulinelor; — scăderea β_1-siderofilinei, a ceruloplasminei şi a albuminei; — concomitent cresc important: α_2-haptoglobulina; α_2-lipoproteina; α_2-macroglobulina şi β_2-lipoproteina
Mielom	— cresc γ, β_2A şi proteina Bence-Jones
Boala Waldenström	— creşte β_2M
Stări inflamatoare	— cresc: — γ-globulinele; — β_2-globulinele; — haptoglobulina; — uneori şi β_2M (Kala-Azar)
Lupus eritematos diseminat	— creşterea haptoglobulinelor şi γ-globulinelor; — scăderea albuminelor
Epiteliom	— creşte hepatoglobulina şi α_2M — uneori şi γ-globulinele cresc, iar β_2, de asemenea
Limfogranulomatoza malignă (puseu evolutiv)	— cresc hepatoglobulinele şi γ-globulinele
Leucemia limfoidă	— scad γ- şi β_2-globulinele
Proteinuria ortostatică şi lordotică	— Prezintă următoarele componente în ordine descrescîndă: — albumine; — siderofiline (β_1-globuline); — γ-globuline şi α_1-globuline principale (postalbumine); — ceruloplasmina (α_2-globuline); — orosomucoide (α_1-globuline); — haptoglobuline (α_2); — β_1-globuline, β_2-globuline A; — α_1-, α_2-globuline; — α_1- şi α_2-lipoproteine.

pH-METRIA

Definiţie: se înţelege prin pH, concentraţia în ioni H^+ dintr-o soluţie, exprimată prin intermediul logaritmilor în bază 10, după formula:

$$pH = -\log [H^+]$$

Din această notare, reiese imediat, că la concentraţii crescînde de $[H^+]$ corespund numere descrescînde. Se vede, de asemenea, că pH exprimă *aciditatea ionică* sau *aciditatea reală* a soluţiei, adică numărul de H^+ existenţi în stare liberă. Cu alte cuvinte, pH-ul este funcţie de disociaţie. Teoretic, o soluţie acidă *total disociată*, de normalitate 0,1 va avea pH conform formulei:

$$pH = -\log 0{,}1 = 1.$$

Trebuie precizată distincția față de *aciditatea totală* sau *de titrare*, care exprimă numărul total de H^+ dintr-o soluție, fie liberi, fie combinați cu anioni, sub formă de molecule nedisociate.

În felul acesta, 2 acizi, de aceeași normalitate, de exemplu: HCl și CH_3-COOHN, au aceeași aciditate totală, determinată prin titrare, dar au cu totul altă aciditate ionică, fiind diferit disociați, deci au și un pH cu totul deosebit.

$$HCl\ N \rightarrow pH = 0,1$$

$$CH_3.COOH\ N \rightarrow pH = 2,44$$

Apa pură prezintă o disociație extrem de mică. Reacția este următoarea:

$$H_2O \rightleftarrows H^+ + OH^-$$

Aplicînd ecuației legea acțiunii maselor, obținem:

$$\frac{[H^+]\ [OH^-]}{[H_2O]} = K \text{ sau } [H^+]\ [OH^-] = K.\ [H_2O].$$

Valoarea lui K, determinată conductometric, este pentru 18° $= 10^{-14,14}$.

Deci:

$$[H^+] = [OH^-] = \sqrt{10^{-14,14}} = 10^{-7,07}$$

S-a convenit, pornind de la considerentele expuse, a se considera pH = 7 ca reprezentînd o *soluție neutră*, întrucît conține un număr egal de ioni H^+ și OH^-. Valorile sub 7,00 reprezintă pH-urile acide, iar cele peste 7,00 reprezintă pe cele bazice.

Relația dintre disociere și pH

Să reprezentăm schematic, disocierea unei soluții acide AH; vom obține:

$$AH \rightleftarrows A^- + H^+$$

Aplicînd legea acțiunii maselor se obține:

$$\frac{[A^-]\ [H^+]}{[AH]} = K \text{ și } [H^+] = K\ \frac{[AH]}{[A^-]}$$

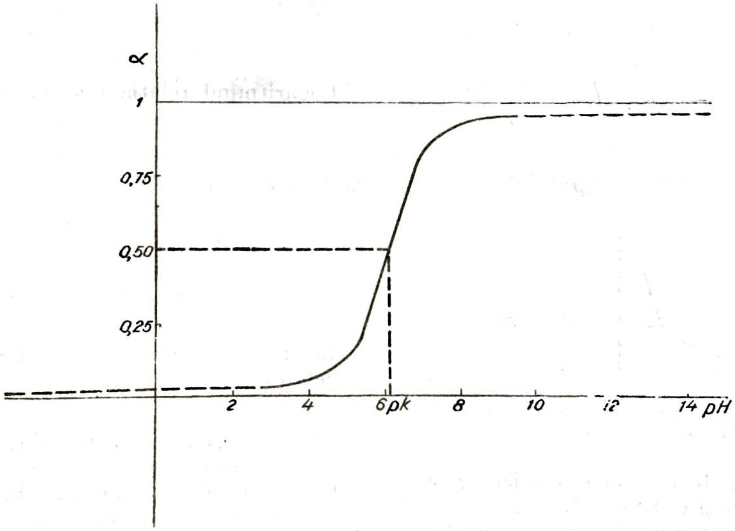


Fig. 26. — Gradul de disociere în funcție de pH (curbă teoretică).

Cum disocierea apei este extrem de mică, se poate considera (neglijînd această fracțiune) cantitatea de molecule nedisociate drept constantă și vom obține:

$$[H^+]\ [OH^-] = K$$

Logaritmînd valoarea lui $[H^+]$ se obține:

$$\log\ [H^+] = \log K + \log \frac{[AH]}{[A^-]} \text{ și } -\log\ [H^+] =$$

$$= -\log K - \log \frac{[AH]}{[A^-]}$$

Notînd pe — log $K = pK$ (prin analogie cu notația pH) și trecînd la pH, deducem:

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

Să notăm cu m, concentrația moleculară a soluției și cu α gradul de disociere. Vom obține:

$$[A^-] = m.\alpha$$
$$[AH] = (m - m.\alpha) = m\ (1-\alpha)$$

În acest caz relația pH-ului devine:

$pH = pK + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$, ceea ce poate fi reprezentat ca ecuație exponențială $\alpha = f$ (pH).

Această ecuație exponențială, reprezentată grafic în curba din fig. 26 arată că disocierea este cu atît mai mare, cu cît pH este mai ridicat. Dacă acesta este suficient de ridicat, toți acizii sînt complet disociați.

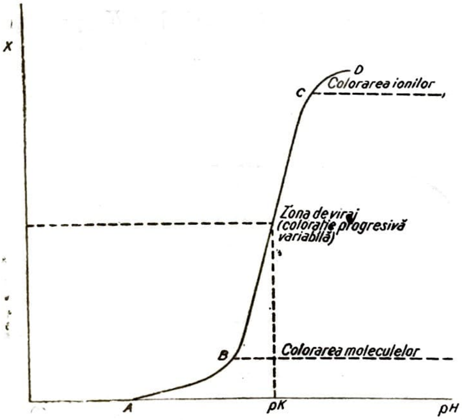


Fig. 27 — Variația culorii unui indicator colorat în funcție de pH.

Așa se explică de ce, cei doi acizi considerați mai sus, HCl și CH_3COOH, la concentrații moleculare egale, au aceeași aciditate de titrare. Aciditatea ionică însă — exprimată prin pH final, corespunzător disociației totale — va fi diferită, pH va fi cu atît mai mare, cu cît acidul este mai puțin disociat la început. Dacă valoarea lui α, în ecuația de mai sus este $\alpha = 0{,}5$ se vede că:

$$pH = pK.$$

Se numește pK unui acid, pH-ul soluției sale, cînd gradul de disociere este egal cu 0,5.

Măsurarea pH

Se face după două metode: metoda colorimetrică și metoda electrometrică.

I. *Metoda colorimetrică de determinare a pH*

Principiul metodei colorimetrice. Metoda se bazează pe utilizarea așanumiților *indicatori colorați.* Ei sînt substanțe organice, a căror culoare, în soluție, variază în funcție de pH. Un indicator poate fi considerat un acid slab, disociat după ecuația:

$$AH \rightleftharpoons A^- + H^+ \text{ sau } \frac{[A^-]\,[H^+]}{[AH]} = K$$

Notînd cu β fracțiunea indicatorului disociat se obține:

$$[A^-] = \beta$$
$$[AH] = 1 - \beta$$

Atunci:

$$[H^+] = K\,\frac{[AH]}{[A^-]} = K\,\frac{1-\beta}{\beta}$$

Logaritmînd relația obținem:

$\log\,[H^+] = \log\,K + \log \frac{[AH]}{[A^-]}$ și trecînd la notația de pH:

$$pH = pK + \log\,\frac{1-\beta}{\beta}$$

$$\text{sau}\ \log\,\frac{1-\beta}{\beta} = \text{pH} - \text{pK}$$

Ecuația de mai sus poate fi pusă sub forma funcției:

$$\beta = f\,(pH)$$

a cărei reprezentare grafică este dată în fig. 27.

Se vede din curba respectivă că dacă pH-ul este foarte scăzut valoarea lui β este foarte mică. În acest caz, culoarea este dată de moleculele nedisociate. Dacă pH-ul crește, β tinde spre 1. La un pH suficient de ridicat, culoarea este dată de ionii A^-. Între aceste limite, există o întreagă zonă, numită *zonă de viraj*, în care se realizează o proporționalitate între pH și creșterea ionilor A^- pe seama moleculelor AH. Pe curba din figura 27 se disting deci 3 regiuni:

1. intervalul AB, în care culoarea indicatorului este dată de culoarea moleculelor nedisociate AH ($\beta \simeq 0$);
2. intervalul BC, în care culoarea indicatorului este funcţie de pH (β = variabil);
3. intervalul CD, în care culoarea indicatorului este dată de culoarea ionilor A^-($\beta \simeq 1$).

Practica determinării colorimetrice a pH—ului

Presupune două etape de lucru : determinarea ordinului de mărime al pH-ului şi determinarea exactă a acestuia, cu aproximaţie de 0,1—0,2 u.

Determinarea ordinului de mărime a pH-ului. Se face, fie cu sistemul hîrtiei indicatoare, fie cu sistemul indicatorilor universali.

a) *Sistemul hîrtiei indicatoare.* Este, de fapt, o colorimetrie prin cromatografie. Hîrtiile indicatoare sînt fîşii de hîrtie de filtru, impregnate cu indicatori convenabil aleşi. Se folosesc :

— hîrtia de turnesol, care indică doar aciditatea sau alcalinitatea unei soluţii;

— hîrtia indicator cu macrodiviziuni, care indică scara pH-ului de la 1—14, cu diviziuni din 1 în 1 unităţi;

— hîrtia indicator cu microdiviziuni, care arată, scara pH-ului de la 1—14 cu diviziuni din 0,2 unităţi.

b) *Sistemul indicatorilor universali.* Indicatorii universali sînt indicatori cu zonă de viraj foarte extinsă. La 1 ml soluţie de cercetat se adaugă o picătură reactiv şi în funcţie de culoarea obţinută, se stabileşte zona de pH.

Dăm formulele cîtorva indicatori universali utilizaţi în laborator :

1. Indicatorul *Amsden — Bogen* :

Fenolftaleină	100 mg.
Roşu de metil	200 mg.
Dimetil-amino-azo-benzen	300 mg.
Albastru de bromtimol	400 mg.
Albastru de timol	500 mg.
Alcool etilic 95°	500 ml.

NaOH 0,1 N pînă la apariţia culorii galbene.

Zonele de indicaţie ale pH-ului cu indicatorul Amsden-Bogen :

pH	Culoare :
2,0	Roz.
4,0	Roşu-oranj.
6,0	Galben.
8,0	Verde.
10,0	Albastru.

2. Indicatorul *Guillaumin* :

Roşu de metil	125 mg.
Albastru de bromtimol	400 mg.
NaOH 0,1 N	0,5 ml.

Substanţele sînt bine triturate în mojar şi reluate în balon cotat, la 1 000 ml apă.

Zonele de indicaţie ale pH-ului cu indicatorul Guillaumin :

pH	Culoare :
4,0	Roşu.
5,0	Portocaliu.
6,0	Galben.
7,0	Verde.
8,0	Verde-albastru.
9,0	Albastru.

Determinarea pH-ului cu aproximaţia de 0,1—0,2 u. Se poate face utilizînd soluţii standard de indicatori sau soluţii standard de tampoane.

a) *Determinarea colorimetrică a pH-ului, prin metoda indicatorilor.* În cele ce urmează descriem metodele Hellige şiMichaelis, cele mai utilizate metode în practica laboratorului clinic :

— *Metoda Hellige.* Utilizează un comparator special, cu discuri colorate. Într-una din cuvele comparatorului se introduc 10 ml din proba de cercetat şi 0,5 ml soluţie de indicator Hellige şi în cealaltă cuvă se introduce proba de cercetat simplă. Comparatorul este prevăzut cu o serie de discuri, ce pot fi montate pe un ax central.

Discurile prezintă rondele colorate, mobile, dînd unităţile de pH din 0,2 în 0,2 diviziuni (fig. 28). Se alege discul corespunzînd zonei de pH determinată anterior printr-una din metodele de aproximaţie, se adaugă la probă 0,5 ml din indicatorul corespunzător zonei respective şi se rotesc rondelele colorate, pînă ce, privind prin lupa comparatorului, distingem ambele cuve la aceeaşi intensitate de culoare. Dăm, în continuare, indicatorii Hellige, cu zonele respective de pH :

Indicator Hellige	*Zona de pH a discului respectiv*
Tropeolină	1,6—3,2
α-dinitrofenol	2,8—4,4
Metiloranj	2,8—4,4
Verde de bromcrezol	3,8—5,4
γ-dinitrofenol	4,0—5,4
Roşu de metil	4,4—6,0
Paranitrofenol	5,4—7,0
Roşu de bromfenol	5,4—7,0
Albastru de bromtimol	6,0—7,6
Roşu de fenol	6,8—8,4
Metanitrofenol	6,8—8,4
Albastru de timol	8,0—9,6
Fenolftaleină	8,6—10,2
Woftolviolet	10,2—11,8

Metoda Michaelis. Utilizează indicatorii din seria nitrofenolilor. Din soluţiile stoc ale indicatorilor, se fac diluţii cu CO_3Na_2 0,1 N, ce corespund pH-urilor indicate în tabelele alăturate. Etaloanele se prepară în modul următor: se aleg eprubete din sticlă incoloră, cu diametrul cît se poate mai egal. În fiecare eprubetă se introduce o soluţie 1/10 din soluţia stoc, în cantităţile necesare (v. ,,Manual de laborator clinic", ed. I, p. 67) şi se completează la volumul de 7 ml cu CO_3Na_2 0,1 N. Eprubetele se închid la flacără şi se notează pe fiecare pH-ul corespunzător.

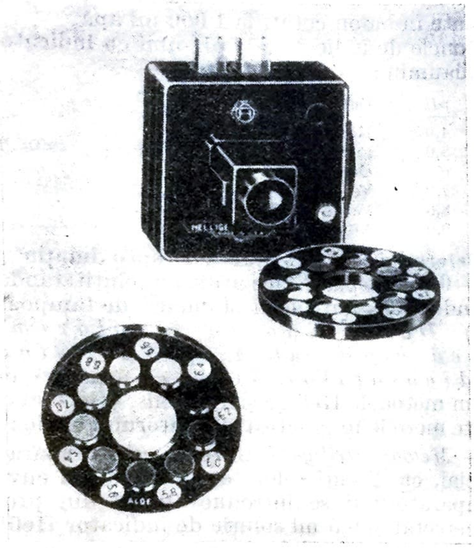


Fig. 28. — Comparatorul de pH tip Hellige.

Soluţiile stoc pentru indicatorii Michaelis:

Seria I: α-dinitrofenol 0,05% în apă distilată. Zona de viraj 2,8—4,4.

Seria a II-a: γ-dinitrofenol 0,025% în apă distilată. Zona de viraj 4,0—5,4.

Seria a III-a: *p*-dinitrofenol 0,1% în apă distilată. Zona de viraj 5,4—7,0.

Seria a IV-a: m-dinitrofenol 0,3% în apă distilată. Zona de viraj 6,8—8,4.

Determinarea pH-ului se face cu blocul comparator. El este un bloc de lemn sau alt material (fig. 29), prevăzut cu 4 orificii în care se introduc 4 eprubete, cîte 2 faţă în faţă. În dreptul fiecărei serii de 2 eprubete, se găseşte cîte un orificiu, prin care se privesc eprubetele respective. Practic, se introduc cele 4 eprubete în următoarele poziţii şi următoarea compoziţie.

eprubeta 1
6 ml soluţie de cercetat
1 ml soluţie indicator stoc

eprubeta a 2-a
7 ml apă distilată

eprubeta a 3-a
tubul cu indicatorul standard

eprubeta a 4-a
6 ml soluţie de cercetat
1 ml apă distilată

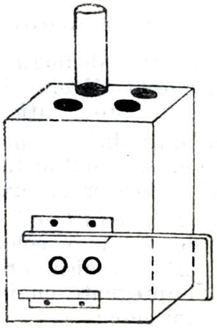


Fig. 29. — Blocul comparator.

Se schimbă tubul cu indicatorul standard din orificiul 3, pînă cînd, privind prin cele 2 orificii ale comparatorului, observăm că cele două seturi de eprubete aşezate faţă în faţă, au aceeaşi culoare.

b) *Determinarea colorimetrică a pH-ului, prin metoda soluţiilor standard de tampon.* Se determină zona de pH cu ajutorul uneia din metodele descrise. Se adaugă la 10 ml probă de cercetat 1 ml indicator, din seria celor care au zonă de viraj similară zonei de pH aproximativ determinată. Se iau o serie de cîteva eprubete, în care se introduc 10 ml soluţie-tampon, de pH-uri diferite — în cadrul zonei respective — şi se adaugă în fiecare 1 ml din indicatorul respectiv. Se tatonează la blocul comparator, fiecare soluţie-tampon, pînă la obţinerea egalităţii de culoare. pH-ul tamponului cu care s-a obţinut egalitatea de culoare este pH-ul soluţiei de determinat.

Poziţiile eprubetelor în comparator, la metoda tampoanelor:

(1)
soluţia de cercetat
+
indicator
(2)
apă distilată

(3)
soluţia-tampon de pH cunoscut
+
indicator
(4)
soluţia de cercetat

Dăm în cele ce urmează, cele mai utilizate tampoane de lucru.

Soluții tampon după Sörensen. **Soluțiile stoc din care se obțin sistemele tampon sînt următoarele :**

1. **Soluție de acid clorhidric ClH N/10. 3,64 g ClH la 1 litru apă distilată.**
2. **Soluție de hidrat de sodiu NaOH N/10. 4 g NaOH la 1 litru apă distilată.**
3. Soluție de glicocol N/10 + soluție de clorură de sodiu N/10. 7,50 g glicocol + 5,85 g clorură de sodiu la 1 litru apă.
4. Soluție de fosfat monopotasic $\frac{M}{15}$. 9,078 g PO_4H_2K la 1 litru de apă distilată.
5. **Soluție de fosfat disodic $\frac{M}{15}$·11,87 g PO_4HNa_2 cu $2H_2O$ la 1 litru apă distilată.**
6. **Soluție de citrat de sodiu N/10. 21,008 g acid citric+200 ml soluție de hidrat de sodiu N, se completează totul la 1 litru apă distilată.**
7. **Soluție de borat N/10. 12,404 g de acid boric + 100 ml soluție de hidrat de sodiu N, se completează totul la 1 litru apă distilată.**

Din soluțiile stoc se fac amestecuri după tabelele respective.

TABELUL 22

Amestec de glicocol — acid clorhidric

Glicocol N/10 (soluția a 3-a) (ml)	Acid clorhidric N/10 (soluția 1) (ml)	pH amestec	Glicocol N/10 (soluția a 3-a) (ml)	Acid clorhidric N/10 (soluția 1) (ml)	pH amestec
—	—	—	5,0	5,0	1,93
—	10	1,04	6,0	4,0	2,28
1	9,0	1,15	7,0	3,0	2,61
2,0	8,0	1,25	8,0	2,0	2,92
3,0	7,0	1,42	9,0	1,0	3,34
4,0	6,0	1,65	9,5	0,5	3,68

TABELUL 23

Amestec glicocol — hidrat de sodiu

Glicocol N/10 (soluția a 3-a) (ml)	NaOH N/10 (soluția a 2-a) (ml)	pH amestec	Glicocol N/10 (soluția a 3-a) (ml)	NaOH N/10 (soluția a 2-a) (ml)	pH amestec
—	—	—	5,0	5,0	11,30
9,5	0,5	8,57	4,9	5,1	11,56
9,0	1,0	8,93	4,5	5,5	12,09
8,0	2,0	9,36	4,0	6,0	12,40
7,0	3,0	9,72	3,0	7,0	12,67
6,0	4,0	10,14	2,0	8,0	12,86
5,5	4,5	10,48	1,0	9,0	12,97
5,1	4,9	11,07	—	10,0	13,06

TABELUL 24

Amestec de fosfați

Fosfat disodic (soluția a 5-a) (ml)	Fosfat monopotasic (soluția a 4-a)(ml)	pH amestec	Fosfat disodic (soluția a 5-a) (ml)	Fosfat monopotasic (soluția a 4-a) (ml)	pH amestec
0,25	9,75	5,29	5,0	5,0	6,81
0,5	9,5	5,59	6,0	4,0	6,98
1,0	9,0	5,91	7,0	3,0	7,17
2,0	8,0	6,24	8,0	2,0	7,38
3,0	7,0	6,47	9,0	1,0	7,73
4,0	6,0	6,64	9,5	0,5	8,04

TABELUL 25

Amestec citrat — acid clorhidric

Citrat (soluția a 6-a) (ml)	Acid clorhidric (soluția 1) (ml)	pH amestec	Citrat (soluția a 6-a) (ml)	Acid clorhidric (soluția 1) (ml)	pH amestec
—	—	—	5,0	5,0	3,69
—	10,0	1,04	5,5	4,5	3,95
1,0	9,0	1,17	6,0	4,0	4,16
2,0	8,0	1,42	7,0	3,0	4,45
3,0	7,0	1,92	8,0	2,0	4,65
3,33	6,67	2,27	9,0	1,0	4,83
4,0	6,0	2,97	9,5	0,5	4,89
4,5	5,5	3,36	10,0	—	4,96
4,75	5,25	3,53			

TABELUL 26

Amestec citrat — NaOH

Citrat (soluția a 6-a) (ml)	NaOH (soluția a 2-a) (ml)	pH amestec	Citrat (soluția a 6-a) (ml)	NaOH (soluția a 2-a) (ml)	pH amestec
—	—	—	6,0	4,0	5,97
9,5	0,5	5,02	5,5	4,5	6,33
9,0	1,0	5,11	5,25	4,75	6,68
8,0	2,0	5,51	4,5	5,5	12,07
7,0	3,0	5,57	4,0	6,0	12,37

TABELUL 27

Amestec borat — acid clorhidric

Borat soluția a 7-a (ml)	Acid clorhidric soluția 1 (ml)	pH amestec	Borat soluția a 7-a (ml)	Acid clorhidric soluția 1 (ml)	pH amestec
—	—	—	7,5	2,5	8,80
5,25	4,75	7,62	8,0	2,0	8,91
5,5	4,5	7,94	8,5	1,5	9,01
5,75	4,25	8,14	9,0	1,0	9,09
6,0	4,0	8,29	9,5	1,5	9,16
6,5	3,5	8,50	10,0	—	9,24
7,0	3,0	8,68			

TABELUL 28

Amestec borat — NaOH

Borat (soluția a 7-a) (ml)	NaOH (soluția a 2-a) (ml)	pH amestec	Borat (soluția a 7-a) (ml)	NaOH (soluția a 2-a) (ml)	pH amestec
—	—	—	7,0	3,0	9,67
9,0	1,0	9,36	6,0	4,0	9,97
8,0	2,0	9,50	4,0	6,0	12,37

Soluția tampon după Clark și Lubs. Soluțiile stoc din care se obțin sistemele tampon sînt următoarele :

8. Soluție de clorură de potasiu N/5 = 14,912 g ClK la 1 litru de apă distilată.
9. Soluție de ftalat acid de potasiu N/5 = = 40,83 g$KHC_8H_4O_4$ la 1 litru apă distilată.
10. Soluție fosfat primar de potasiu N/5 = = 27,24 g PO_4H_2K la 1 litru apă distilată.
11. Soluție N/5 de acid boric și clorură de potasiu = 12,40 g de $B(OH)_3$ + 14,91 ClK la 1 litru apă distilată.
12. Soluție de hidrat de sodiu N/5 = 8 g NaOH la 1 litru apă distilată.
13. Soluție de acid clorhidric N/5 = 7,2 ClH la 1 litru apă fiartă.

Din soluțiile stoc se fac amestecuri după tabelele respective.

Pentru sistemele tampon efectuate după formulele lui Clark și Lubs se completează volumul indicat în tabel la 200 ml cu apă distilată.

TABELUL 29

Amestec clorură de potasiu — acid clorhidric

Clorură de K (soluția a 8-a) (ml)	Acid clorhidric (soluția a 13-a) (ml)		pH amestec	Clorură de K (soluția a 8-a) (ml)	Acid clorhidric (soluția 1) (ml)		pH amestec
—	—	Se aduce la 200 ml cu apă distilată	—			Se aduce la 200 ml cu apă distilată	
50	61,5	,,	1,2	50	16,6	,,	1,6
50	41,5	,,	1,4	50	10,6	,,	2,0
50	26,3	,,	1,6	50	6,7	,,	2,2

TABELUL 30

Amestec ftalat — acid clorhidric

Ftalat (soluția a 9-a) (ml)	Acid clorhidric (soluția a 13-a) (ml)		pH amestec	Ftalat (soluția a 9-a) (ml)	Acid clorhidric (soluția a 13-a) (ml)		pH amestec
—	—	Se aduce la 200 ml cu apă distilată	—			Se aduce la 200 ml cu apă distilată	
50	46,70	,,	2,2	50	14,70	,,	3,2
50	39,60	,,	2,4	50	9,90	,,	3,4
50	32,95	,,	2,6	50	5,97	,,	3,6
50	26,42	,,	2,8	50	2,63	,,	3,8
50	20,32	,,	3,0			,,	

TABELUL 31

Amestec ftalat — NaOH

Ftalat (soluția a 9-a) (ml)	NaOH (soluția a 12-a) (ml)		pH amestec	Ftalat (soluția a 9-a) (ml)	NaOH (soluția a 12-a) (ml)		pH amestec
—	—	Adus la 200 ml cu apă distilată	—			Adus la 200 ml cu apă distilată	
50	0,40	,,	4,0	50	29,95	,,	5,2
50	3,70	,,	4,2	50	35,45	,,	5,4
50	7,50	,,	4,4	50	39,85	,,	5,6
50	12,15	,,	4,6	50	43,00	,,	5,8
50	17,70	,,	4,8	50	45,45	,,	6,0
50	23,85	,,	5,0	50	47,00	,,	6,2

TABELUL 32

Amestec fosfat — NaOH

Fosfat monopotasic (soluția a 10-a) (ml)	NaOH (soluția a 12-a) (ml)		pH amestec	Fosfat monopotasic (ml)	NaOH (soluția a 12-a) (ml)		pH amestec
—	—	Adus la 200 ml cu apă distilată	—			Adus la 200 ml cu apă distilată	
50	3,72	,,	5,8	50	29,63	,,	7,0
50	5,70	,,	5,0	50	35,00	,,	7,2
50	8,60	,,	6,2	50	39,50	,,	7,4
50	12,60	,,	6,4	50	42,80	,,	7,6
50	17,80	,,	6,6	50	45,20	,,	7,8
50	23,65	,,	6,8	50	46,80	,,	8,0

TABELUL 33

Amestec de acid boric — clorură de potasiu

Clorură de potasiu-acid boric (soluția a 11-a) (ml)	NaOH (soluția a 12-a) (ml)		pH amestec	Clorură de potasiu-acid boric (soluția a 11-a) (ml)	NaOH (soluția a 12-a) (ml)		pH amestec
—	—	Adus la 200 ml cu apă distilată	—			Adus la 200 ml cu apă distilată	
50	2,61	,,	7,8	50	21,30		9,0
50	3,97	,,	8,0	50	26,70	,,	9,2
50	5,00	,,	8,2	50	33,00	,,	9,4
50	8,50	,,	8,4	50	36,85	,,	9,6
50	12,00	,,	8,6	50	40,80	,,	9,8
50	16,30	,,	8,8	50	43,90	,,	10,0

Soluțiile-tampon Walpole. Soluțiile stoc:

a) acetat de sodiu M/5. 16,4 g acetat de sodiu sînt dizolvate în 1 000 ml apă distilată.

b) acid acetic M/5. 12 g acid acetic glacial la 1 000 ml apă distilată. Din soluțiile stoc se fac amestecuri după tabelele respective.

TABELUL 34

Amestec de acetat de sodiu — acid acetic

pH	Acid acetic (soluția *b*) (ml)	Acetat de sodiu (soluția *a*) (ml)	pH	Acid acetic (soluția *b*) (ml)	Acetat de sodiu (soluția *a*) (ml)
3,6	0,185	0,015	4,8	0,080	0,120
3,8	0,176	0,024	5,0	0,059	0,141
4,0	0,164	0,036	5,2	0,042	0,158
4,2	0,147	0,053	5,4	0,029	0,171
4,4	0,126	0,074	5,6	0,019	0,181
4,7	0,102	0,098			

Soluțiile-tampon McIlvain. Soluțiile stoc:

a) soluția PO_4HNa_2 M/5, 35,62 g PO_4HNa_2 sînt dizolvate în 1 000 ml apă;

b) soluția acid citric M/10, 21,01 g acid citric sînt dizolvate în 1 000 ml apă. Din soluțiile stoc se fac amestecuri după tabelele respective.

TABELUL 35

Na_2HPO_4 0,2 M (soluția *a*) (ml)	Acid citric 0,1 M (soluția *b*) (ml)	pH	Na_2HPO_4 0.2 M (soluția *a*) (ml)	Acid citric 0.1 M (soluția *b*) (ml)	pH
0,40	19,60	2,2	10,72	9,28	5,2
1,18	18,76	2,4	11,15	8,85	5,4
2,18	17,82	2,6	11,60	8,40	5,6
3,17	16,83	2,8	12,09	7,91	5,8
4,11	15,89	3,0	12,63	7,37	6,0
4,94	15,06	3,2	13,22	6,78	6,2
5,70	14,30	3,4	13,85	6,15	6,4
6,44	13,56	3,6	14,55	5,45	6,6
7,10	12,90	3,8	15,45	4,55	6,8
7,71	12,29	4,0	16,47	3,53	7,0
8,28	11,72	4,2	17,39	2,61	7,2
8,82	11,18	4,4	18,17	1,83	7,4
9,35	10,65	4,6	18,73	1,27	7,6
6,87	10,14	4,8	19,15	0,85	7,8
10,30	9,70	5,0	19,45	0,55	8,00

Soluțiile-tampon Michaelis. Soluții stoc:

1. Dietil-barbiturat de sodiu N/10. Soluția stoc de dietilbarbiturat de sodiu se prepară dizolvînd 10,30 g veronal sodic în 1 000 ml apă distilată.
2. Acid clorhidric N/10.

Din soluțiile stoc se fac amestecuri după tabelele respective.

TABELUL 36

pH	Veronal sodic N/10 (soluția 1) (ml)	HCl N/10 (soluția 2) (ml)	pH	Veronal sodic N/10 (soluția 1) (ml)	HCl N/10 (soluția 2) (ml)
6,8	5,22	4,78	8,4	8,23	1,77
7,0	5,36	4,64	8,6	8,71	1,29
7,2	5,54	4,46	8,8	9,08	0,92
7,4	5,81	4,19	9,0	9,35	0,65
7,6	6,15	3,85	9,2	9,52	0,48
7,8	6,62	3,38	9,4	9,74	0,26
8,0	7,16	2,84	9,6	9,85	0,15
8,2	7,69	2,31			

Tampon Britton și Robinson. Soluția tampon după Britton și Robinson este un amestec de acid fosforic, acid acetic și acid boric. Se iau 3,92 g acid fosforic, 240 g acid acetic și 2,48 g acid boric și se dizolvă în 1 000 ml apă distilată la balon cotat. La 40 ml din acest amestec se adaugă cantități crescînde de NaOH N/5 date în tabelul de mai jos.

TABELUL 37

Tamponul universal Britton și Robinson

pH	1,81	1,89	1,98	2,09	2,21	2,36	2,56
ml NaOH N/5	0	1	2	3	4	5	6
pH	2,87	3,29	3,78	4,10	4,35	4,56	4,78
ml NaOH N/5	7	8	9	10	11	12	13
pH	5,02	5,33	5,72	6,09	6,37	6,59	6,80
ml NaOH N/5	14	15	16	17	18	19	20
pH	7,00	7,24	7,54	7,96	8,36	8,69	8,95
ml NaOH N/5	21	22	23	24	25	26	27
pH	9,15	9,33	9,62	9,91	10,38	10,88	11,20
ml NaOH N/5	28	29	30	31	32	33	34
pH	11,40	11,58	11,70	11,82	11,92	11,98	—
ml NaOH N/5	35	36	37	38	39	40	

Metoda electrometrică de determinare a pH-ului

Principiul metodei electrometrice se bazează pe relația potențialului de electrod a lui *Nernst*:

$$E = \frac{RT}{nF} ln \frac{C_1}{C_2}, \qquad (1)$$

în care: R = constanta gazelor perfecte;
T = temperatura exprimată în °K;
n = valența metalului respectiv;

F = încărcătura electrică a unui echivalent gram;

C_1 și C_2 = concentrațiile ionilor metalici, de o parte și de alta a unei membrane poroase.

Formula ne permite calcularea diferenței de potențial, care se stabilește cînd se separă printr-o membrană poroasă două soluții de concentrații diferite, dintr-o sare a aceluiași metal.

Dacă metalul din sarea considerată este hidrogenul, formula (1) devine:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{[H^+]_1}{[H^+]_2} \qquad (2)$$

Trecînd la logaritmii în bază 10, formula devine — prin constanta de convertire (2, 3):

$$E = \frac{2{,}3\ RT}{F} \log \frac{[H^+]_1}{[H^+]_2} \qquad (3)$$

Dacă se ia soluția 1, de o concentrație cunoscută, egală cu unitatea, formula (3) devine:

$$E = \frac{2{,}3\ RT}{F} \log \frac{1}{[H^+]_2}, \text{ dar } \log \frac{1}{[H^+]} = \text{pH, deci:}$$

$$E = \frac{2{,}3\ RT}{F} \cdot pH \qquad (4)$$

Înlocuind în formulă pe R și F cu valorile lor obținem: $R = 8{,}32$; $F = 96\,500$:

$$E = 19{,}83 \ .\ 10^{-5}\ TpH. \qquad (5)$$

Pentru temperatura de 20° relația (5) devine:

$$E = 0{,}058\ pH \text{ sau } pH = \frac{E}{0{,}058} \qquad (6)$$

Rezultă din formula de mai sus că se poate determina pH-ul unei soluții, prin măsurarea diferenței de potențial la o temperatură stabilită.

Problema practică se rezumă la construirea electrozilor speciali și la montarea unor dispozitive, capabile a stabili exact diferența de potențial.

Electrozii utilizați în determinarea electrometrică a pH-ului sînt principial de 2 categorii:

a) electrodul de referință sau electrodul normal de hidrogen este constituit din semipila care rezultă prin introducerea electrodului de hidrogen, în soluția normală de ioni (H^+);

b) electrodul de măsură, constituit din semipila care rezultă prin introducerea electrodului de hidrogen, în soluția de pH necunoscut.

a) *Electrodul de referință.* În practică, se utilizează mai rar electrodul normal de hidrogen propriu-zis, din cauza manipulării dificile, care necesită un curent de hidrogen. Un tip modern de astfel de electrod îl reprezintă electrodul Iena pentru hidrogen. El este format dintr-un fir de platină (1), îmbrăcat într-o cămașă de sticlă; contactul cu soluția se face printr-un vîrf. Curentul de hidrogen, obținut de la o bombă de hidrogen pur este introdus prin robinetul R și iese prin vîrful deschis al cămășii de sticlă.

Caracteristicile electrodului de hidrogen sînt:

— poate fi folosit pe întreaga scară de pH (0—14);

— nu poate fi folosit în cazul soluțiilor oxidante, reducătoare, care conțin CO_2 sau metale grele.

Cauze de eroare: saturarea insuficientă a electrodului cu hidrogen, curent de hidrogen impurificat cu oxigen, otrăvuri de contact, proteine în soluție.

Mult mai frecvent este utilizat electrodul de calomel. Acesta este constituit dintr-un fir de platină (1) amalgamat într-o pastă formată din Hg, calomel (Cl_2Hg_2) și KCl în contact printr-o membrană poroasă cu o soluție de KCl. De obicei, soluția de clorură de potasiu din electrod este saturată, existînd însă și tipuri la care concentrația este N sau 0,1 N. La vîrful firului de platin se găsește o picătură de mercur pur. Contactul firului cu exteriorul se face prin borna de legătură, iar contactul soluției de KCl cu soluția de cercetat se face printr-un fir de azbest, de la vîrful electrodului.

Trebuie menționat că potențialul electrodului de calomel (E_o) este diferit de cel al electrodului de hidrogen (E). Făcînd corecția respectivă se obține:

$$\text{pH} = \frac{E - E_o}{0{,}058}$$

Dăm în tabelul 38 valoarea lui E_o pentru diferite temperaturi, în cazul soluției saturate și N de KCl.

TABELUL 38

Temperatura	E_o pentru soluția KCl N/1	E_o pentru soluția KCl saturată
15°	0,285 2	0,252 5
18°	0,284 2	0,2503
20°	0,283 3	0,248 8
23°	0,282 6	0,246 8
25°	0,281 9	0,245 8
30°	0,280 2	0,243 4

b) *Electrodul de măsură.* Este de mai multe tipuri. Cele mai întrebuinţate sînt electrodul de chinhidronă şi, în special, electrodul de sticlă.

Electrodul de chinhidronă. Este, de fapt, un electrod de hidrogen, în care gazul se utilizează la presiune scăzută, fiind format în interiorul lichidului, printr-o reacţie chimică.

Chinhidrona, în soluţie apoasă, se descompune în chinonă şi hidrochinonă, după formula:

$$\underset{\textit{Chinhidronă}}{C_{12}H_{10}O_4} \rightarrow \underset{\textit{Chinonă} \; + \; \textit{Hidrochinonă}}{C_6H_4O_2 + C_6H_4(OH)_2}$$

Hidrochinona disociază slab în chinonă şi hidrogen, după formula:

$$C_6H_4(OH)_2 \rightleftarrows C_6H_4O_2 + H_2.$$

Aplicînd acestei formule legea acţiunii maselor obţinem:

$$\frac{[H_2]\ [\text{Chinona}]}{[\text{Hidrochinona}]} = K.$$

Se poate admite că cele 2 concentraţii de chinonă şi hidrochinonă sînt egale şi că $K = H_2$.

Electrodul de chinhidronă este constituit practic dintr-un electrod de platin care se introduce în soluţia de cercetat, la care se adaugă o mică cantitate de chinhidronă.

În cazul în care măsurarea se face utilizînd ca electrod de referinţă electrodul de calomel, trebuie stabilită valoarea potenţialului electrodului de chinhidronă, faţă de potenţialul electrodului normal de hidrogen.

Relaţia pentru determinarea pH în acest caz, devine:

$$\text{pH} = \frac{E_0 - E_c - E}{0{,}058},$$

în care:

E_0 = potenţialul electrodului de chinhidronă faţă de potenţialul electrodului normal de hidrogen;

E_c = potenţialul electrodului de calomel;

E = diferenţa de potenţial a pilei respective.

Pentru temperatura de 20°, relaţia devine, înlocuind valorile respective:

$$\text{pH} = \frac{0{,}454 - E}{0{,}058},$$

electrodul de chinhidronă fiind pozitiv faţă de electrodul de calomel.

Caracteristicile electrodului de chinhidronă:

— poate fi folosit numai pe intervalul 0—8,5 pentru soluţiile tamponate şi 0—6 pentru soluţiile netamponate;

— nu poate fi folosit în cazul soluţiilor alcaline, puternic reducătoare sau puternic oxidante.

Cauze de eroare: chinhidronă impurificată, prezenţa proteinelor în sistem, a otrăvurilor de contact sau a concentraţiilor mari de săruri.

Electrodul de sticlă. Dacă se separă două soluţii cu concentraţii de ioni H^+ diferită printr-o peliculă foarte fină de sticlă (0,2 mm), membrana se comportă ca şi cînd ar lăsa să treacă doar ionii de hidrogen şi apare o diferenţă de potenţial, dată de relaţia:

$$E = K + \frac{2{,}3\,RT}{F} \log \frac{[H^+]_1}{[H^+]_2}.$$

Dacă considerăm una din concentraţiile de ioni H^+ cunoscută şi egală cu unitatea, relaţia devine, în raport cu electrodul de referinţă calomel:

$$E = K + E_o + \frac{2{,}3\,RT}{F} \log \frac{1}{[H^+]_2} \text{ sau notînd}$$

$$\text{pe } E_o = K_1 \text{ şi } \log \frac{1}{[H^+]_2} = pH_2$$

$$E = K + K_1 + \frac{2{,}3\,RT}{F} = pH_2$$

K este o constantă care depinde de forma geometrică şi natura membranei foarte fine de sticlă considerate. Ea se numeşte *potenţialul asimetric* şi se determină măsurînd diferenţa de potenţial ce se stabileşte între două soluţii de pH cunoscut.

Electrodul de sticlă este format dintr-o bulă de sticlă extrem de fină, în interiorul căreia se găseşte o soluţie HCl 0,03 N (sau uneori un tampon cunoscut) (vezi fig. 30). În această soluţie pătrunde un fir metalic (de obicei de argint), protejat printr-o cămaşă de sticlă. Datorită fragilităţii foarte mari, electrodul de sticlă trebuie manipulat cu foarte mare atenţie şi ţinut în apă distilată. Pentru măsurarea pH-ului cu electrod de sticlă, se utilizează drept electrod de referinţă calomelul. Se face întîi determinarea diferenţei de potenţial ce se stabileşte în cazul unei soluţii-tampon de pH cunoscut şi apoi se face măsurarea pH-ului soluţie de cercetat (vezi tehnica determinării cu pH-metrul).

Utilizarea electrodului de sticlă, din cauza rezistenţei interne foarte mari, necesită instrumente de măsură speciale (vezi descrierea ulterioară a pH-metrelor).

Caracteristicile electrodului de sticlă :

— poate fi folosit pe întreaga scară de pH între 0 și 13;

— nu poate fi folosit în cazul soluțiilor concentrate de ioni Na^+ și K^+ și în cazul soluțiilor puternic acide sau puternic alcaline.

Dispozitivele utilizate la măsurarea diferenței de potențial. În mod curent se întrebuințează 2 sisteme de măsură.

1. Metoda clasică, zisă *de opoziție* a lui Poggendorf.

2. Metoda modernă, a milivoltmetrului electronic.

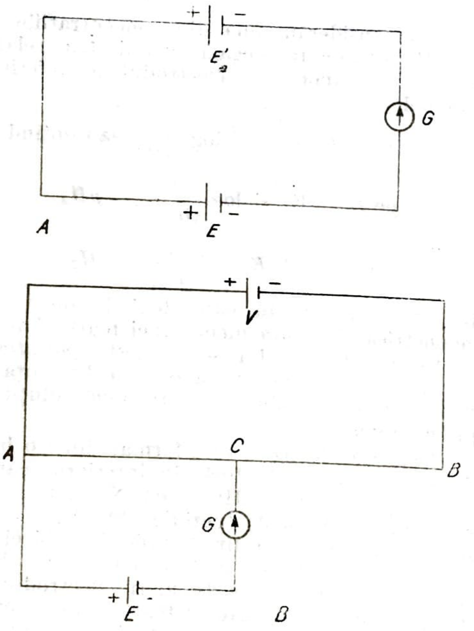


Fig. 30. — Principiul metodei Poggendorf de măsurare a pH.

A – Principiul metodei de opoziție.
B – Principiul montajului potențiometric la metoda de opoziție.

Principiul metodei Poggendorf. Se bazează pe montarea în opoziție a doi generatori de forță electromotrice E și E'. În acest caz, se poate măsura forța electromotrice a pilei E, dacă se variază diferența de potențial E', pînă ce galvanometrul E_1 nu mai indică trecerea curentului electric. Diferența de potențial E' se obține cu ajutorul unui fir potențiometric AB (fig. 30 B) legat cu un generator de curent ce dă o diferență de potențial constantă.

Principiul metodei milivoltmetrului electronic. Se bazează pe proprietatea lămpilor triodice de a funcționa ca amplificatoare de curent. Într-adevăr, dacă se aplică o diferență de potențial foarte slabă între masă și grilă, se obține, pe circuitul-placă, o variație de intensitate mult mai mare (vezi reprezentarea schematică în fig. 31). Deoarece rezistența circuitului grilă este foarte mare, intensitatea curentului grilă poate fi neglijată. Se poate deci, aplica diferența de potențial ce urmează a fi determinată direct în E, și apoi după amplificare să fie citită direct pe galvanometrul G. În felul acesta se etalonează cadranul galvanometrului în mV și în unități de pH.

Măsurarea practică a pH-ului cu pH-metrul electronic. pH-metrele electronice sînt aparate moderne, ce permit determinarea directă a pH-ului, citit pe un cadran, cu ajutorul electrodului de sticlă, avînd ca referință electrodul de calomel (acesta fiind lanțul de electrozi cel mai utilizat).

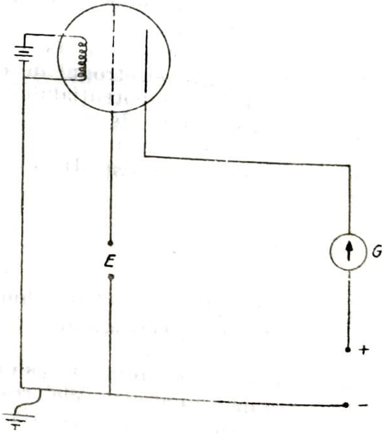


Fig. 31. — Principiul milivoltmetrului electronic.

Conform teoriei amintite la electrodul de sticlă, se face întîi corecția aparatului cu ajutorul unei soluții-tampon de pH cunoscut, apoi se determină direct pH-ul soluției dorite, citindu-se cifra respectivă pe cadranul galvanometrului. De obicei — cu toate diferențele în funcție de tipul fabricației — metoda practică de lucru este principial aceeași. În cele ce urmează, descriem manipularea pH-metrului de fabricație maghiară, tip „*Orion*" (fig. 32).

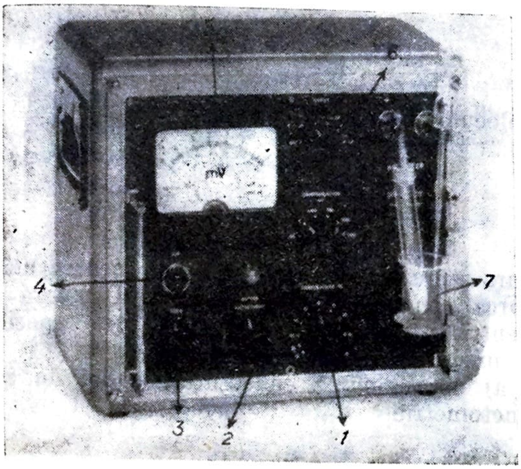


Fig. 32. — pH metrul tip Orion (R.P.U.).

Se introduce aparatul în priză, se deschide din butonul 4 și se lasă 15 minute pentru încălzire.

Se fixează acul indicator al cadranului exact pe zero, cu butonul 3. La unele tipuri de aparate, aceasta se face cu o șurubelniță, manevrînd un șurub plasat de obicei pe cadranul indicatorului milivoltmetric.

Se comutează butonul 1 de corecție a temperaturii la cifra corespunzătoare temperaturii la care se lucrează.

Se fixează cu butonul 6 scala pe care se va face citirea (de obicei sînt două scale 0—7 și 7—14, unele tipuri de aparate, construite pentru scopuri biologice — tip Pusl sau Astrup —, au și scale extinse pentru pH-urile cuprinse între 6 și 9). Se introduce apoi în vasul 7 soluția-tampon cu un pH foarte bine determinat (preparat riguros după tabele), se introduc cei 2 electrozi de sticlă și de calomel în vas și se ajustează din butonul 2 („buffer adjustment") pH-ul, de așa manieră, încît să citim pe cadran indicația corespunzătoare pH-ului soluției-tampon. Se înlocuiește apoi în vasul 7 soluția-tampon cu soluția de analizat. Se introduc electrozii în soluție și se citește, direct pe galvanometru, valoarea pH-ului căutat.

La unele aparate moderne, de tip Pusl sau Astrup, s-au construit blocuri electrode unice, cuprinzînd în aceeași montură — de sticlă sau plexiglas —, atît electrodul de sticlă, cît și cel de calomel.

Valorile normale ale pH-ului diferitelor lichide biologice

— *pH-ul sanguin* (măsurat în ser) = 7,30 — 7,45. (Trebuie evitat orice contact cu aerul, altfel valorile falsificîndu-se și urcîndu-se între 7,35 și 7,65).

— *pH-ul lichidului cefalorahidian* = 7,52 — 7,85.

— *pH-ul salivar* = 6,50 — 6,80 (fără contact cu aerul);
6,80 — 7,20 (după contactul cu aerul).

— *pH-ul sucului gastric* = 1,5 — 1,8 (la adult, după prînz de probă), în jur de 5 la sugar.

— *pH-ul sucului pancreatic* = 7,5 — 8,5.

— *pH-ul sucului intestinal* = 7,5 — 8,5.

— *pH-ul bilei* = în jur de 8.

Dăm în fig. 33 pentru exemplificare, variația pH-ului de-a lungul tractului digestiv.

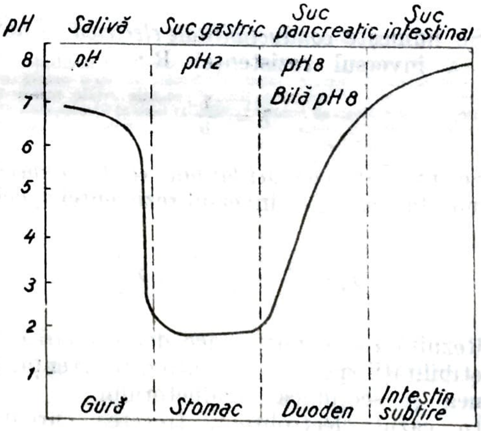


Fig. 33. — Schema variației pH în tractul digestiv.

Conductometria

Noțiuni fundamentale asupra conductibilității și rezistivității

Se numesc conductori de gradul I sistemele care realizează conducerea electricității, prin migrarea electronilor liberi, fără a produce transformări chimice (de exemplu: metalele în stare solidă sau topită).

Se numesc conductori de gradul al II-lea, sistemele care realizează conducerea electricităţii, prin intermediul ionilor încărcaţi (+) sau (—) şi care dau naştere la electrozi unor fenomene chimice, numite în mod generic, „fenomene de electroliză'' (de exemplu: lichidele biologice).

Se numesc conductori micşti — în număr mai restrîns — sistemele care realizează conducerea electricităţii în ambele moduri (de exemplu: soluţii concentrate de elemente alcalinoteroase, în amoniac lichid).

Legea lui Ohm stabileşte că rezistenţa electrică a unui conductor depinde de natura, cît şi de lungimea şi secţiunea sa. Pentru un conductor omogen avem:

$$R = \rho \frac{l}{s}$$

ρ = rezistenţa specifică a conductorului dat;
l = lungimea;
s = secţiunea,
de unde:

$$\rho = R \frac{s}{l}$$

Se numeşte *conductibilitate electrică* — notată cu λ inversul rezistenţei R:

$$\lambda = \frac{1}{R}$$

Se numeşte *conductibilitate electrică specifică* — notată cu λ_s — inversul rezistenţei specifice ρ:

$$\lambda_s = \frac{1}{\rho} = \frac{1}{R} \cdot \frac{l}{s} = \lambda \frac{l}{s}$$

Rezultă că se poate face determinarea conductibilităţii specifice, măsurînd rezistenţa, lungimea şi secţiunea conductorului.

În cazul electroliţilor, trecerea curentului electric provoacă polarizarea electrozilor, ceea ce duce la creşterea rezistenţei electrice a soluţiei respective. Pentru a evita acest lucru, se utilizează curentul alternativ.

În principiu, determinarea constă din plasarea soluţiei de cercetat într-un vas prevăzut cu doi electrozi, care se introduce în locul rezistenţei, în dispozitivul punţii Wheatstone (vezi metoda Kohlrausch).

Se execută o determinare de rezistivitate şi se notează inversul valorii obţinute. Cum rezultatele depind de forma, secţiunea şi distanţa electrozilor, raportul $\frac{l}{s}$, care este caracteristic pentru fiecare vas de conductometrie, a luat numele de *constanta celulei* sau *capacitatea de rezistenţă a vasului* şi se notează cu C. Din formula:

$$\lambda_s = \lambda \frac{l}{s}$$

înlocuind pe $\lambda = \frac{1}{R}$ şi $\frac{l}{s} = C$ avem

$$\boxed{\lambda_s = \frac{1}{R} \cdot C}$$

care reprezintă formula de lucru pentru măsurarea conductibilităţii specifice. Urmează că, pentru a măsura conductibilitatea specifică a unei soluţii trebuie executate:

a) determinarea constantei celulei de conductometrie

$$(C = \frac{l}{s});$$

b) determinarea rezistenţei R a soluţiei de cercetat, în celula respectivă.

Constanta celulei se determină pe o cale indirectă, măsurînd rezistenţa unei soluţii etalon, de concentraţie şi conductibilitate cunoscută. Fie λ_0 conductibilitatea soluţiei etalon, cunoscute.

Fie R_0 rezistenţa citită în celula respectivă. În acest caz:

$$C = \lambda_0 R_0$$

PRINCIPIUL MĂSURĂRII REZISTENŢEI UNEI SOLUŢII DE ELECTROLIT, DUPĂ METODA KOHLRAUSCH

Metoda cea mai uzuală, pentru determinarea rezistenţei unui electrolit, aplicată la lichidele biologice, este metoda Kohlrausch. Ea utilizează o punte Wheatstone, cu curent alternativ, pentru a reduce la minimum fenomenul de polarizare (fig. 34).

În acest montaj, curentul trece printr-un fir calibrat şi perfect omogen *a-b*, de 1 m lungime. În ramura *a-d* a punţii, se intercalează o rezistenţă cunoscută R, iar în ramura *d-b*, se intercalează conductorul a cărui rezistenţă x se caută.

Mutînd cursorul de-a lungul firului alb, se determină, la un moment dat, un raport $\frac{ac}{cb}$, de aşa manieră ca galvanometrul G să nu indice trecerea curentului prin punte. Puntea în acest caz este echilibrată şi vom obţine:

$$\frac{R}{x} = \frac{ac}{cb}$$

Pentru determinarea punctului zero, se poate utiliza o cască telefonică sau fanta luminoasă a unui ochi magic (vezi „Determinarea practică").

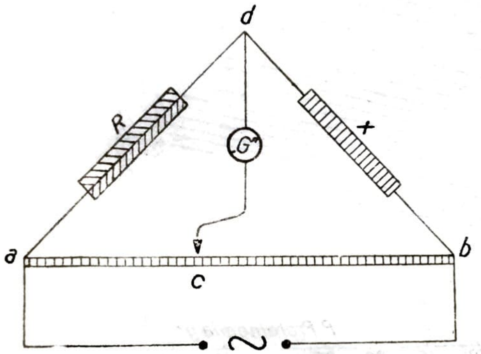


Fig. 34. — Principiul de funcţionare a punţii.

Puntea Kohlrausch de fabricaţie romînească, tip „ER. Termotehnica"

În cele ce urmează, dăm modul de lucru, cu puntea Kohlrausch de fabricaţie romînească.

Descrierea aparatului. Aparatul cuprinde următoarele părţi principale (fig. 35):

1. un oscilator RC de 1 000 Hz, de tipul cu reţea defazoare. S-a ales frecvenţa respectivă, pentru a elimina o serie de fenomene parazitare;
2. puntea propriu-zisă, care este o punte Wheatstone cu record (cursor). Echilibrul se obţine prin variaţia recordului (cursorul 5 din figură), iar alegerea domeniilor de măsurare se face cu comutatorul de scale (butonul 3 din figură), pe una din cele 4 scale ale aparatului (7 pe figură);
3. amplificatorul, care este construit din două etaje RC, cu tuburi electronice. Sensibilitatea sa este reglată cu ajutorul unui potenţiometru de 0,5 MΩ (butonul 1 din figură);
4. indicatorul de echilibru, care este un indicator optic (poziţia 6 pe figură), montat ca detector pe grilă şi care la echilibru face ca fanta luminoasă să se îngusteze. Poziţiile de echilibru ale fantei luminoase sînt reprezentate în figura 36.

Echilibrul punţii poate fi detectat şi cu ajutorul unei căşti telefonice (9 pe figură), montată la bornele 8. În acest caz, poziţia de echilibru este dată de momentul în care la cască se aude un zgomot minim;

5. etajul de alimentare, care este compus din transformatorul de reţea, tubul electronic redresor şi celula de filtraj.

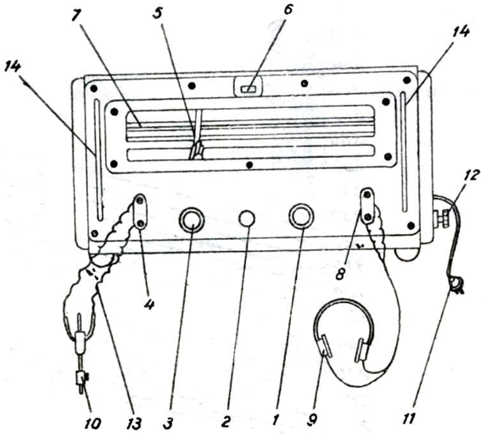


Fig. 35. — Puntea Kohlrausch (Conductometru) tip „Termotehnica" Bucureşti.

1—potenţiometru; *2*—buton pentru controlul etalonării: *3*—comutator pentru scala de măsură; *4*—buton pentru conectarea celulei; *5*—cursor pentru echilibru (record); 6—indicator optic de echilibru; *7*—scale predate în ohmi (4 scale); *8*—buton de legătură pentru căşti; *9*—căşti; *10*—celulă: *11*—cordon de alimentare; *12*—fir de punere la pămînt: 13—fire de legătură pentru celulă: *14*—mînere pentru manipularea aparatului.

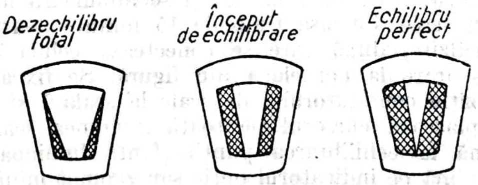


Fig. 36. — Indicatorul optic de echilibru.

Caracteristicile tehnice: domeniile de lucru ale aparatului sînt:

— scala I de la 145 la 180 Ω;
— scala a II-a de la 179 la 223 Ω;
— scala a III-a de la 221 la 274 Ω;
— scala a IV-a de la 269 la 334 Ω.

Eroarea aparatului: ± 2,5%.

Sensibilitatea aparatului: ± 0,5 Ω.

Alimentarea: la rețeaua de 120/220 V. Puterea absorbită, circa 30 W.

Punerea în funcțiune a aparatului. Înainte de punerea în funcțiune, se va verifica conectarea la pămînt. Se introduce aparatul în priză, cu butonul 11 din figură. Dacă aparatul este în stare de funcționare, se aprinde indicatorul optic de echilibru și se luminează una din scale. Se lasă timp de 15 minute pentru încălzire, după care se conectează celula de măsurare la bornele 4 din figură. Se fixează poziția comutatorului de scale la scala I și se deplasează cursorul pe toată lungimea scalei pînă la echilibrarea punții (fanta luminoasă minimă pe indicatorul optic sau zgomot minim la cască). Dacă acest lucru nu se poate realiza pe prima scală, se mută comutatorul pe scala a II-a, a III-a și respectiv a IV-a, pînă la obținerea echilibrării.

Executarea unei măsurări de rezistivitate a plasmei

În mod curent, în determinările clinice, se obișnuiește a se măsura, *nu* conductibilitatea specifică (λ_s) ci rezistența specifică (ρ). În acest caz avem:

$$\rho = \frac{1}{\lambda s} = \frac{R}{C}.$$

Practic, se face prelevarea sîngelui pe un anticoagulant *nesalin*, de obicei heparina. Se centrifughează și se recoltează plasma. Se introduce plasma în celulă, avînd grijă să nu apară bule de aer și electrozii să fie complet acoperiți. Se introduce celula într-o baie termostat la 18° și se lasă timp de 2—3 minute pentru echilibrare termică. În cazul în care se fac determinări la alte temperaturi, se face corecția după metoda ce va fi expusă. Se deplasează cursorul aparatului pe rînd, la fiecare din scale, pînă cînd se obține echilibrul punții. În acest moment, se citește gradația din dreptul cursorului, gradație ce reprezintă rezistența în Ohmi.

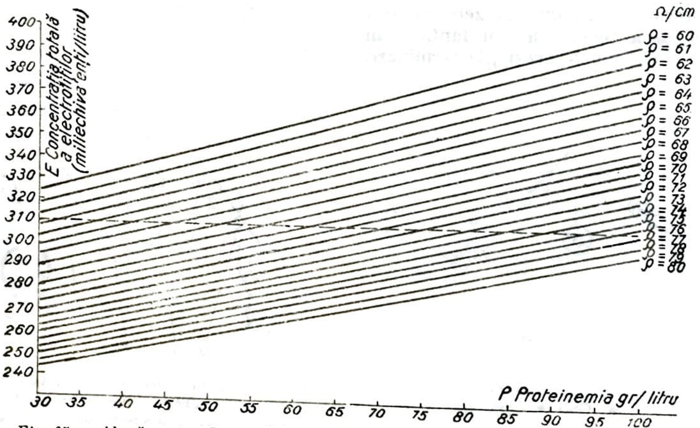


Fig. 37. — Abacă pentru determinarea de mEq din valorile rezistivității și proteinemiei.

Să presupunem că la echilibrul punții am citit valoarea 224 Ω lucrînd cu o celulă a cărei constantă C = 3,2. În acest caz:

$$\rho = \frac{R}{C} = \frac{224}{3,2} = 70 \ \Omega$$

Rezultatele se exprimă în Ω/cm la 18°.

Valorile normale ale rezistivității plasmei la 18° sînt cuprinse între 90 și 100 Ω/cm. Pentru temperatura de 37°, valorile sînt ceva mai scăzute, variind în jurul lui 70 Ω/cm.

S-a observat, că proteinele plasmei au asupra conductibilității o acțiune dublă:

a) măresc conductibilitatea prin ionii proteici;

b) micșorează conductibilitatea prin particulele proteice respective.

Din această interacțiune rezultă un efect pozitiv asupra conductibilității plasmatice, care la o valoare normală a proteinemiei ($p = 75$ g/l) se ridică la aproximativ 16 mEq. Pornind de la aceste fapte, Gram și Cullen, au introdus noțiunea de *conductibilitate corectată* (λ_c) derivabilă din *conductibilitatea măsurată* (λ) cu ajutorul proteinemiei P, exprimată în g/l prin formula :

$$\lambda_c = \frac{\lambda .\ 100}{100 - 0{,}22\ P}$$

În practica curentă a laboratorului, se determină, de obicei, doar rezistivitatea (ρ). Foarte adeseori, însă, se cere exprimarea rezultatelor, nu în rezistivitate, ci în corespondența de mEq plasmatici totali.

Pentru aceasta, se utilizează formula empirică a lui Davidoff și Sautier, valabilă pentru determinarea la 37° :

$$\text{mEq/l} = \frac{1{,}8 \times 10^6}{\rho\,(100 - 0{,}25\ 0)}$$

În același scop dăm în figura 37 o abacă pentru convertirea valorilor rezistivității, la 37°, în mEq. Pe abscisă s-au reprezentat valorile proteinemiei (P), exprimate în g/l, iar pe ordonată concentrația totală de electroliți (E) exprimată în mEq/l. Corelația este stabilită prin curbele ce exprimă valorile lui ρ la 60 – 80 Ω/cm.

Din punctul corespunzător proteinemiei probei de cercetat, se ridică o perpendiculară pînă la curba corespunzătoare lui ρ determinat la punte. Din acest al doilea punct, se duce o paralelă cu abscisa, pînă la ordonată, unde se citește valoarea corespunzătoare a lui E, exprimată în mEq/l.

Determinarea constantei celulei

Aparatele pentru măsurarea conductibilității se livrează de obicei cu celule a căror constantă a fost determinată și indicată pe celula respectivă. Deoarece, cu timpul, survin mici variații, este necesară refacerea constantei, la o perioadă de aproximativ 3 luni de întrebuințare.

Principial, constanta unei celule se face măsurînd rezistența R_0 a unei soluții etalon de ClK, cu o conductibilitate (λ) cunoscută, în cuva respectivă. Pentru calcul aplicăm formula :

$$C = \lambda \cdot R_0$$

De exemplu, dacă se lucrează cu o soluție de ClK 0,1 N, a cărei conductibilitate (λ) la 37° este de 0,015 96 (vezi tabelul nr. 39) atunci :

$C = 0{,}015\,96 \times R_0$ (determinat la punte).

Dăm în tabelul nr. 39 valorile conductibilității soluțiilor de ClK, pentru diferite temperaturi.

TABELUL 39

Conductibilitatea soluțiilor de ClK

Normalitate	N	$\frac{N}{10}$	$\frac{N}{50}$	$\frac{N}{100}$
Concentrația g/l	74,6	7,46	1,492	0,746
5°	0,074 14		0,001 75	0,000 896
10°	0,083 19		0,001 99	0,001 02
15°	0,092 52	0,011 9	0,002 24	0,001 14
18°	0,102 07		0,002 39	0,001 22
20°	0,111 80		0,002 50	0,001 28
25°		0,012 88	0,002 76	0,001 41
30°		0,014 12	0,003 03	0,001 55
37°		0,015 96		

Platinarea electrozilor

După un număr mai mare de determinări electrozii celulei de conductometrie trebuie replatinați. Pentru aceasta, se întrebuințează una din următoarele metode, după ce în prealabil celula a fost bine curățată :

1. Se introduce în celulă o soluție de acid hexacloroplatinic 5% și se leagă la bornele unui acumulator de 2V.

Se lasă curentul să treacă un minut, după care se inversează polii acumulatorului. Se repetă operația timp de 15 minute, apoi se spală celula cu apă distilată. Se umple din nou cu apă distilată și se repetă operația de trecere a curentului, timp de 15 minute.

2. Se introduce în celulă o soluție formată din :

cloroplatinat de K	0,30 g ;
acetat neutru de Pb	0,003 g ;
apă distilată	10 ml

Se leagă electrozii la bornele unui acumulator de 4 V și se lasă timp de 3 minute. Pe unul din electrozi se va depune un depozit negru. Se inversează sensul curentului și se platinează similar al doilea electrod.

Se spală apoi celula cu apă distilată, apoi cu acid sulfuric diluat şi din nou cu apă distilată, de mai multe ori.

Corecţia de temperatură

Cînd nu se lucrează în băi termostate de precizie, la 18°, valorile conductibilităţii (λ) trebuie corectate. În acest scop, dăm în tabelul 40 coeficientul de corecţie *K* al lui Guillard, pentru temperaturile cuprinse între 5 şi 28°.

Conductibilitatea la 18° (λ_{18}) se poate calcula, din conductibilitatea temperaturii la care se lucrează (λ_t) utilizînd coeficientul *K* după formula :

$$\lambda_{18} = K \cdot \lambda_t$$

Valori normale :

$$\text{În plasmă}: \left.\begin{array}{l} 90 - 100\ \Omega/\text{cm} \\ \text{pentru } 18° \\ 69 - 71\ \Omega/\text{cm} \\ \text{pentru } 37° \end{array}\right\} \begin{array}{l} \text{corespunzător} \\ \text{la aproximativ} \\ 310\ \text{mEq/l.} \end{array}$$

În lichidul cefalorahidian : 120 Ω/cm pentru 18°.

Valori peste 100 Ω/cm pentru 18° indică o deperdiţie de electroliţi plasmatici, iar valori sub 90 Ω/cm pentru 18° arată o concentrare în electroliţi plasmatici, peste concentraţia globală de 310 mEq/l.

Metoda prezintă o reală valoare orientativă în clinică, pentru cazurile de reechilibrări hidro-electrolitice.

METODE CROMATOGRAFICE DE ANALIZĂ

Cromatografia — imaginată de botanistul rus Ţvet încă din 1903 — este o metodă analitică, de separare a mai multor componente chimice dintr-un amestec. Ea a luat în ultimii ani o foarte mare dezvoltare, devenind din ce în ce mai utilizată în cercetarea şi analiza de laborator.

I. CROMATOGRAFIA DE PARTIŢIE

Principiu. Cromatografia de partiţie are drept principiu separarea componentelor dintr-un amestec pe baza coeficientului de repartiţie diferit, între două lichide parţial miscibile :

TABELUL 40

Coeficientul k pentru corectarea conductibilităţii funcţie de temperatură

Grade	Zecimi de grad									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	1,427	1,422	1,417	1,413	1,408	1,403	1,329	1,395	1,390	1,385
6	1,381	1,377	1,372	1,368	1,364	1,360	1,355	1,351	1,347	1,343
7	1,339	1,335	1,330	1,326	1,322	1,318	1,314	1,310	1,307	1,303
8	1,299	1,295	1,291	1,287	1,284	1,280	1,276	1,272	1,269	1,265
9	1,261	1,257	1,254	1,250	1,247	1,243	1,239	1,236	1,232	1,229
10	1,225	1,222	1,219	1,216	1,212	1,209	1,205	1,202	1,199	1,195
11	1,192	1,189	1,186	1,183	1,179	1,176	1,173	1,169	1,166	1,163
12	1,160	1,157	1,154	1,151	1,148	1,145	1,142	1,139	1,136	1,133
13	1,130	1,127	1,124	1,121	1,118	1,115	1,112	1,109	1,106	1,104
14	1,101	1,098	1,095	1,093	1,090	1,088	1,085	1,082	1,080	1,077
15	1,074	1,071	1,068	1,066	1,063	1,061	1,058	1,055	1,053	1,050
16	1,048	1,045	1,043	1,040	1,038	1,036	1,033	1,031	1,028	1,026
17	1,024	1,021	1,019	1,016	1,014	1,012	1,009	1,007	1,004	1,002
18	1,000	0,998	0,996	0,993	0,991	0,989	0,987	0,985	0,982	0,980
19	0,978	0,976	0,974	0,971	0,969	0,967	0,965	0,963	0,960	0,958
20	0,956	0,954	0,952	0,950	0,948	0,946	0,944	0,942	0,940	0,938
21	0,936	0,934	0,932	0,930	0,924	0,926	0,924	0,922	0,920	0,918
22	0,916	0,914	0,912	0,910	0,908	0,906	0,904	0,902	0,900	0,899
23	0,897	0,895	0,893	0,892	0,890	0,888	0,886	0,885	0,883	0,881
24	0,879	0,877	0,876	0,874	0,872	0,870	0,867	0,867	0,865	0,863
25	0,861	0,859	0,858	0,856	0,854	0,852	0,849	0,849	0,847	0,846
26	0,844	0,842	0,841	0,839	0,837	0,835	0,833	0,831	0,829	0,828
27	0,826	0,824	0,822	0,820	0,819	0,817	0,815	0,814	0,813	0,811

o fază apoasă și un amestec de solvenți neapoși. Faza apoasă este menținută staționară printr-un suport, care în cromatografia pe hîrtie este hîrtia de filtru cu porozitate constantă (Martin, Synge, Gordon și Gonsden).

Faza mobilă este reprezentată de solventul neapos, care se deplasează de-a lungul porilor hîrtiei. În decursul acestei deplasări are loc o continuă redistribuire a substanțelor din amestec între cele două faze lichide.

Întrucît componenții biochimici diferiți au coeficienți de repartiție diferiți, viteza de migrare a lor va fi diferită. Se numește *coeficient de repartiție*, notat cu α, raportul stabilit la echilibru între concentrațiile substanței (exprimate în g/ml) în faza apoasă și solventul organic:

$$\alpha = \frac{\text{concentrația substanței de separat în faza apoasă}}{\text{concentrația substanței de separat în solventul organic}}$$

Se numește *constanta R* — raportul dintre deplasarea zonei de substanță dizolvată și deplasarea meniscului solventului.

Cromatografia pe hîrtie reproduce într-o oarecare măsură o distilare fracționată sau o extracție continuă dintr-un sistem lichid-lichid.

Să considerăm coloana cromatografică sub forma unor straturi succesive, cu o grosime de așa manieră, încît între soluția care se scurge prin stratul respectiv și concentrația medie a substanței de cercetat din faza imobilă a stratului să existe un echilibru.

Grosimea unui astfel de strat poartă numele de *înălțimea echivalentă a unui taler teoretic* și se notează cu *h*.

Să facem următoarele notații:

A = suprafața secțiunii transversale a coloanei;

A_i = suprafața secțiunii transversale a fazei lichide imobile;

A_m = suprafața secțiunii transversale a fazei lichide mobile;

A_s = suprafața secțiunii transversale a fazei solide a suportului. În acest caz vom putea scrie

$$A = A_i + A_m + A_s$$

dacă:

V = volumul solventului întrebuințat pentru irigare;

v = volumul substanței dizolvate, introdusă pe primul taler;

r = numărul de ordine al talerului, considerat de la vîrful coloanei;

Q = cantitatea totală de soluție pe talerul r.

În acest caz α și R au respectiv următoarea valoare:

$$R = \frac{Vh/v}{V/A} = \frac{Ah}{v} = \frac{A}{A_m + A_i}$$

$$\alpha = \frac{A}{R_f A_i} - \frac{A_m}{A_i}.$$

Cum valoarea R este greu de măsurat — în cazul cromatografiei pe hîrtie — s-a introdus așa-numitul coeficient R_f.

$$R_f = \frac{\text{distanța străbătută de substanță}}{\text{distanța străbătută de solvent}}$$

În acest caz:

$$R_f = \frac{RA_m}{A} = \frac{A_m}{A_m + \alpha A_i}$$

și

$$\alpha = \frac{A_m}{R_f A_i} - \frac{A_m}{A_i} = \frac{A_m}{A_i}\left(\frac{1}{R_f} - 1\right).$$

În consecință, cu cît valoarea coeficientului de repartiție (α) va fi mai mică, cu atît viteza de deplasare a componentei respective pe hîrtie va fi mai mare. Dintre două substanțe cu R_f diferit, cea cu R_f mai mare va avea și viteză de deplasare mai mare și o vom găsi mai depărtată de start.

PRACTICA CROMATOGRAFIEI DE PARTIȚIE PE HÎRTIE

A. *Metoda cromatografiei descendente*

Cromotografia descendentă este una din metodele cele mai utilizate.

1. *Materiale necesare*: cameră cromatografică, jgheab, hîrtie de filtru specială, lichid de irigare.

În metoda cromatografiei descendente, hîrtia pe care se aplică „probele de analizat" se introduce cu capătul superior într-un jgheab care conține faza mobilă, iar capătul inferior se deplasează în direcție descendentă în camera de cromatografie.

Aparatul pentru cromatografia descendentă este format dintr-o cameră cu pereți de sticlă și dintr-un jgheab fixat în partea de sus a camerei cromatografice (fig. 38).

Camera cromatografică. În timpul desfășurării cromatografiei, evaporarea solventului din hîrtia suspendată trebuie să fie redusă la minimum. Pentru aceasta este necesar să se folosească camere ermetic închise, a căror atmosferă să fie saturată cu vapori din solventul respectiv.

Camerele cu pereţi de sticlă pe cadran de lemn sînt cele mai folosite. Atît muchiile, cît şi cadranul de lemn sînt acoperite cu un strat subţire de parafină.

În partea superioară a camerei se găsesc fixate suporturile pe care sînt sprijinite jgheaburile de sticlă, iar în partea inferioară sînt aşezate vase care conţin stratul apos al solventului.

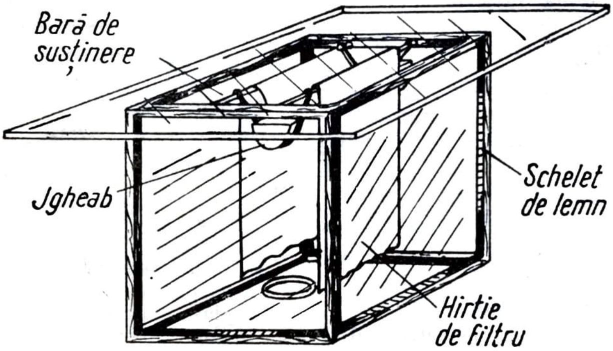


Fig. 38. — Camera cromatografică.

Camera este acoperită ermetic cu o placă groasă de sticlă, peste care se aşază o greutate.

Există şi camere special construite sub formă de dulap ermetic (fig. 39).

Jgheaburile sînt confecţionate din tuburi de sticlă cu diametrul de 4—5 cm şi cu lungimea impusă de dimensiunile camerei cromatografice. Tuburile sînt închise la capete şi prevăzute într-o parte cu o fantă lată de 2 cm şi de lungimea jgheabului. Aceste jgheaburi de sticlă sînt aşezate perfect orizontal în suporturile fixe ale camerei de cromatografie.

Jgheabul este prevăzut în amîndouă părţile cu două baghete de sticlă, la distanţă de 2 cm, peste care se sprijină hîrtia de filtru cu probele de analizat. Aceste suporturi au rolul de a împiedica scurgerea lichidului de irigare sub acţiunea forţelor capilare.

Hîrtia de filtru utilizată în cromatografie trebuie să posede anumite caracteristici, ca: densitate, omogenitate şi puritate. Pentru o desfăşurare corectă, petele sînt aşezate în lungimea hîrtiei de filtru, adică în direcţia fibrelor. Direcţia fibrelor pe hîrtia de filtru poate fi uşor constatată prin aplicarea unei picături de apă; axa mai lungă a elipsei formate indică direcţia fibrelor.

Dăm în tabelul 41 caracteristicile principalelor sorturi de hîrtie cromatografică.

2. *Pregătirea probelor de analizat*. Soluţiei de analizat i se cere un anumit grad de puritate şi o anumită concentraţie, concentraţia optimă fiind în jurul a 1—5%. Această puritate şi concentraţie se realizează prin metode specifice pentru fiecare determinare în funcţie de componenta respectivă.

În studiul compoziţiei chimice a macromoleculelor este necesară hidroliza.

Hidroliza se efectuează la fierbere cu ClH 6N sau $NaOH$ 6N. Substanţa de hidrolizat se pune în tub închis sau în balon cu refrigerent ascendent şi se fierbe timp de 24 de ore.

Pentru zaharuri, hidroliza este de 4 ore cu SO_4H_2 2N; neutralizarea în acest caz se efectuează cu oxid de bariu, în prezenţa indicatorului roşu neutru, iar sulfatul de bariu format se îndepărtează prin centrifugare.

În cazul cînd hidroliza se efectuează cu ClH, acesta se îndepărtează prin evaporare la sec în vid sau pe baia de apă. Stratul subţire

TABELUL 41

Caracteristicile principale ale sorturilor de hîrtie cromatografică

Sortiment	Greutate (g/m^2)	Grosime (mm)	Cenușă (%)	Viteză de migrare
Schleicher & Schüll				
2040 a	90– 95	0,18–0,19	0,04–0,07	Rapidă
2040 b	110–120	0,22–0,24	0,04–0,07	,,
2043 a	90– 95	0,18–0,19	0,04–0,07	Mijlocie
2043 b	110–120	0,20–0,22	0,04–0,07	,,
2045 a	90– 95	0,16–0,17	0,04–0,07	Lentă
2045 b	110–120	0,15–0,17	0,04–0,07	,,
598 G	140–145	0,25–0,28	Aprox. 0,08	Rapidă
2315	150–155	0,29–0,32	Aprox. 0,08	,,
2316	150–155	0,29–0,32	0,05–0,06	,,
60	70	0,16	0,09	Mijlociu-lentă
607	80– 85	0,17	0,07	Lentă
598 YD	100–105	0,26	0,04–0,05	Rapidă
Arches				
301	115	0,24	0,23	Lentă
302	115	0,24	0,08	,,
304	160	0,32	0,08	,,
Whatman				
1	85– 90	0,16	0,06–0,07	Mijlociu-lentă
2	95–100	0,18	0,06–0,07	,,
3	185	0,36	0,06–0,07	Mijlocie
4	90– 95	0,19	0,06–0,07	Rapidă
20	90– 95	0,16	0,06–0,07	Lentă
31-extra groasă	190	0,50	0,025	Extra-rapidă
54	90– 95	0,17	0,025	Rapidă
540	85– 90	0,15	0,08	Mijlocie
541	80– 85	0,16	0,08	Rapidă

de clorhidrați format se reia în apă caldă sau alcool izopropilic 10%. Alcoolul izopropilic constituie un bun mijloc de conservare.

Prin hidroliza acidă (ClH) a extractelor tricloracetice se formează cloroformul, produs care se poate elimina foarte repede prin încălzire la 25°.

Aplicarea ,,probelor de analizat'' pe hîrtia de filtru se execută în cazul unei determinări cantitative cu o micropipetă sau cu o pipetă Pasteur efilată la vîrf. Capătul pipetei se șterge bine cu o hîrtie curată și prin atingerea hîrtiei cu pipeta, soluția de analizat este depusă în locurile fixate cu creion negru. În tehnica cromatografiei descendente, linia de start se face la 6–8 cm de la capătul superior al hîrtiei cromatografice. Distanța între pete trebuie să fie de circa 2,5 cm.

Pentru obținerea rezultatelor bune se depune pe hîrtia de filtru cantitatea de 0,01 ml soluție de cercetat într-o formă circulară cu diametrul de 10 mm. În cazul utilizării unei cantități mai mari sau a unei soluții foarte diluate,

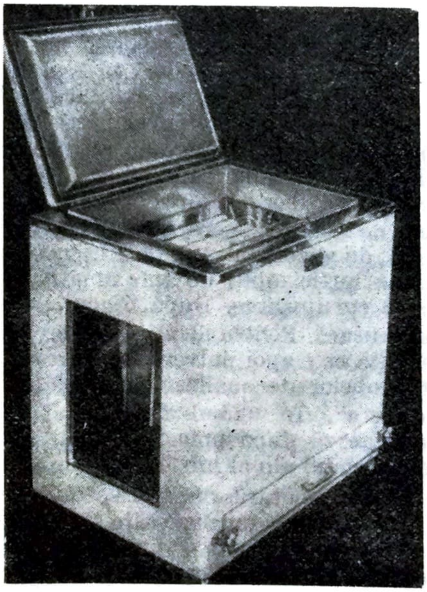


Fig. 39. — **Dulap ermetic.**

soluţia de cercetat se aplică în acelaşi loc în mai multe etape, lăsîndu-se în prealabil să se usuce pata precedentă.

Se întîmplă uneori ca petele foarte mici şi concentrate să nu dea rezultate bune, deoarece concentraţia mare de substanţe împiedică scurgerea uniformă a solventului la nivelul zonei în care s-a aplicat soluţia de cercetat.

După aplicarea şi uscarea lichidului de analizat, hîrtia de filtru se introduce cu capătul superior în jgheab şi se fixează cu baghete de sticlă. Linia cu probele de analizat trebuie să fie la o distanţă de 2 cm de bagheta de susţinere. Apoi jgheabul se umple cu lichidul de irigare specific probelor de analizat şi se lasă la irigat timp de 24—120 de ore. În tot acest interval de timp, temperatura trebuie să fie constantă şi atmosfera saturată cu vaporii lichidului de irigare.

Hîrtiile de filtru, după ce sînt irigate, sînt scoase din cutia cromatografică şi uscate la temperatura camerei sau la etuvă (90—100°). Pentru o bună desfăşurare a componentelor cu R_f mici se irigă de 2—3 ori hîrtia de filtru în felul următor: după 24—48 de ore, cromatograma se usucă la 90—100°, iar după uscare, hîrtia este supusă din nou 48—72 de ore procesului de irigare cu acelaşi solvent şi uscată. Prin irigări repetate se pot obţine pe aceeaşi cromatogramă toate componentele probei de analizat, atît cele cu R_f mici, cît şi cele cu R_f mari. Substanţele cu valoarea R_f mică pot fi separate şi identificate (în special în absenţa substanţelor cu valoare R_f mai mare) şi prin irigare continuă: developarea nu se întrerupe, cînd frontul sistemului de dizolvanţi ajunge la marginea inferioară, ci lasă ca dizolvantul să picure liber din hîrtie. Pentru a evita formarea de curenţi neregulaţi în curgerea sistemului de dizolvanţi se taie la marginea inferioară a hîrtiei dinţi de aproximativ 2 cm lăţime şi 2 cm lungime. După irigare, cromatograma se usucă. Pentru identificare, cromatograma uscată este apoi pulverizată cu reactivul adecvat probelor de analizat „metoda identificării directe''. În cursul uscării la etuvă, etapă ce urmează după umectare, apar petele colorate pe fondul alb al hîrtiei.

Identificarea spoturilor apărute se face comparativ cu o cromatogramă pe care s-au aplicat substanţe-etalon cunoscute. Prin acest procedeu de comparaţie se stabilesc valorile R_f caracteristice fiecărei componente.

Pentru reproductibilitatea R_f trebuie respectate următoarele condiţii:

1. menţinerea unei temperaturi constante;
2. etanşeitatea perfectă a vasului;
3. saturarea mediului din camera cromatografică cu vapori ai solventului respectiv;
4. respectarea condiţiilor descrise la aplicarea substanţelor, la uscarea şi identificarea spoturilor;
5. puritatea şi concentraţia substanţei de analizat;
6. distanţa dintre frontul solventului şi linia de start se impune să fie de cel puţin 20—25 cm, iar durata de irigare minimum 24 de ore.

Dăm în tabelul 42 R_f caracteristice ale unor aminoacizi.

Pentru determinarea spoturilor cromatografice, în afară de metoda identificării directe se pot folosi metode chimice şi fizico-chimice. (Studierea cromatogramelor în lumină ultravioletă, autoradiocromatografii etc.)

Aparatul cromatografic poate fi aşezat într-un loc fără mari variaţii de temperatură, chiar în laborator, însă pentru executarea cromatogramelor în serie este necesară o cameră specială, pentru a se evita, atît variaţiile de temperatură, cît şi atmosfera toxică provocată de solvenţii utilizaţi în cromatografie.

3. *Solvenţii.* În tehnica cromatografică, dizolvanţii organici nemiscibili cu apa sînt cei mai folosiţi. Solvenţii înainte de utilizare sînt saturaţi cu apă. Saturarea se efectuează prin agitarea anumitor cantităţi de solvent cu apă într-o pîlnie de separare. Amestecul se lasă în repaus 1—2 ore, timp în care se formează două straturi net diferenţiate: 1) stratul care conţine solventul saturat cu apă şi 2) stratul apos, utilizat la saturarea cu vapori a camerei cromatografice.

Solvenţilor utilizaţi în cromatografie li se impun următoarele condiţii: nu trebuie să denatureze substanţa de cercetat şi nu trebuie să reacţioneze cu substanţele de identificare, trebuie însă să separe două sau mai multe substanţe cu structură asemănătoare. Diferenţa dintre valorile R_f trebuie să fie de cel puţin 0,05 cm.

Sistemul alcool n-butilic — acid acetic — apă (4 :1 :5) este utilizat în toate domeniile de cercetare cromatografică şi de aceea este numit sistem universal de irigare.

TABELUL 42

Valoarea R_f a unor acizi aminaţi în cîţiva solvenţi mai utilizaţi

Acidul aminat	R_f 1	2	3	4	Culoarea cu ninhidrină
Alanină	.38	.16	.54	.09	Violet
β-alanină	.37	.09			Albastru
Acid α-aminobutiric	.45	.42			Violet
Acid γ-aminobutiric	.50	.11			Violet
Acid α-aminocaprilic	.85				Violet
Acid α-aminoizobutiric	.48	.44			Violet
Arginină	.20	.04	.89	.05	Violet
Asparagină	.19	.06			Violet-brun
Acid asparaginic	.24	.04	.12	.01	Albastru
Citrulină	.25	.08			Violet
Cisteină	.07				Brun
Cistină	.08	.02			Brun
Acid α, γ-diaminobutiric	.12	.05			Violet
Dioxifenilalanină	.24	.15			Violet
Acid glutamic	.30	.04	.13	.01	Violet
Glutatiol	.05				Violet
Glicină	.26	.10	.40	.05	Violet
Glicil-glicină	.22	.06			Violet
Acid hipuric	.93	.81			
Histamină	.22	.18			Brun
Histidină	.20	.08	.68	.09	Violet-brun
Homoserină	.30				Violet
Oxiprolină	.30	.09	.50	.05	Galben-brun
Izoleucină	.72	.44	.81	.40	Violet
Kynurenină	.76				Violet
Leucină	.73	.42	.83	.46	Violet
Lizină	.14	.04	.82	.02	Violet
Metionină	.55	.29	.76	.05	Violet
Metionin sulfonat	.28	.13			Violet
Metionin sulfoxid	.25	.11			Violet
Norleucină	.74		.85	.51	Violet
Norvalină	.65	.42	.79	.31	Violet
Ornitină	.15	.05	.73	.03	Violet
Fenilalanină	.68	.30	.87	.46	Albastru
Prolină	.43	.18			Galben
Serină	.27	.10	.33	.05	Violet
Taurină	.19	.12			Violet
Treonină	.35	.14	.41	.08	Violet
Trimetilalanină	.66	.50			Violet
Triptamină	.73	.55			Brun
Triptofan	.50	.29			Violet-brun
Tirozină	.45	.19	.63	.14	Albastru
Valină	.60	.29	.76	.22	Violet

Sistemul de irigare

1 Butanol-acid acetic-apă

2 Butanol-etanol-apă

3 Fenol-apă-amoniac

4 Butanol-amoniac

Prepararea sistemului universal de irigare

Amestecul format din 400 ml alcool n-butilic + 100 ml acid acetic + 500 ml apă este lăsat în repaus, 3—12 ore, într-o pîlnie de separare. Stratul inferior se îndepărtează, iar stratul superior conţine solventul saturat cu apă.

Pentru reducerea esterificării este necesar ca stratul de alcool butilic să fie păstrat în prezenţa stratului apos.

Solvenţii utilizaţi în cromatografia curentă:

1. Sistemul universal (4 :1 :5).
2. Alcool n-butanol + acid acetic glacial + apă (8 :4 :3).
3. Alcool n-butanol + etanol + acid acetic glacial + amoniac concentrat (40 :10 :49 :1).
4. Alcool n-butanol + piridină + apă (6: 4: 3).
5. Alcool n-butanol + piridină + ClH 10N (5 :3 :2).
6. Alcool n-butanol + acid formic + apă (12 :1 :1), iar după 24 de ore se separă.
7. Alcool n-butanol saturat cu apă (1 :1).
8. Acetat de etil + piridină + apă (2 :1 :2).
9. Acetat de etil + acid acetic + apă (3 :1 :3).
10. Colidină saturată cu apă (125 ml colidină + 44 ml apă).
11. Colidină + lutidină diluată 1/2 + apă (1 :3 :4).
12. Fenol 90%. Se prepară adăugînd 100 ml apă la 900 g fenol cristalizat.
13. Fenol saturat cu apă amoniacală 1% (1: 1).

4. *Revelatorii.* Sînt reactivi care dau, în general, reacţia de culoare şi sînt specifici substanţelor de analizat.

a) *Revelatori pentru aminoacizi.* Soluţia de 1% ninhidrină este revelatorul cel mai folosit şi este comun pentru aminoacizi, peptide, proteine şi amine primare. Coloraţia variază de la albastru la portocaliu, în funcţie de natura aminoacizilor. Soluţia de pulverizat se face de obicei 0,1—0,3% ninhidrină în butanol saturat cu apă, sau alcool 96°, acetonă, izopropanol. La soluţia 0,30% ninhidrină în alcool 96° se poate adăuga 2% cloroform + 5% colidină pentru obţinerea de nuanţe diferite ale spoturilor cromatografice.

Ninhidrina se prezintă sub formă de cristale de culoare galbenă-pai şi are proprietatea de a se dizolva perfect în alcool.

În caz contrar, ninhidrina se purifică în felul următor:

10 g ninhidrină sînt dizolvate în 50 ml ClH 2N. Se încălzeşte pînă la fierbere, iar partea

nedizolvată se separă prin filtrare. Lichidului filtrat i se adaugă 1 g de cărbune activ. Se fierbe şi se agită timp de 10 minute, apoi se filtrează la cald. Cărbunele din pîlnie se spală de trei ori cu ClH 2N, pentru a înlătura pierderile de ninhidrină, iar filtratul total se usucă la vid pe KOH. Cristalele formate se păstrează la întuneric.

După pulverizare, cromatograma se usucă la temperatura laboratorului sau la 105°. Ninhidrina dă spoturi colorate în albastru-violet cu majoritatea aminoacizilor: cu prolină-oxiprolină dă spoturi colorate în galben, iar deseori aceste spoturi sînt acoperite de spoturi albastre-violet. Pentru aceşti aminoacizi se folosesc revelatori speciali.

Prolina şi oxiprolina sînt puse în evidenţă cu revelatorul obţinut prin dizolvarea a 0,2 g izatină în 96 ml butanol + 4 ml acid acetic glacial. Oxiprolina şi prolina dau spoturi galbene.

Triptofanul se pune în evidenţă cu reactivul Ehrlich, preparat prin dizolvarea a 0,5 g p-dimetilaminobenzaldehidă în 99 ml alcool 96°, la care se adaugă 1 ml ClH concentrat.

Pentru intensificarea spoturilor, după uscare la etuvă, cromatograma se ţine 3 ore în atmosferă cu vapori de ClH.

Triptofanul, în aceste condiţii, dă spoturi albastre.

Determinările cantitative ale aminoacizilor se efectuează cu reactivul ninhidrină-clorură de cadmiu.

Reactivul se prepară dizolvînd 0,1 g clorură de cadmiu în 6 ml apă + 0,3 ml acid acetic concentrat; după dizolvarea completă a Cl_2Cd se adaugă 2 g ninhidrină în 94 ml acetonă.

b) *Revelatori pentru glucide.* 1) Metoda cu nitrat de argint amoniacal constă în pulverizarea cromatogramei cu un amestec preparat extemporaneu din NO_3Ag N/10 $+NH_4OH$ 5N (v/v).

Spoturile obţinute sînt de culoare neagră. Reactivul nu este specific, deoarece dă reacţii similare şi cu fenolii.

2. Soluţia de monoanilină a acidului ftalic. Reactivul se prepară prin dizolvarea a 3,3 g acid ftalic + 2 ml anilină concentrată $D=1\,027$ + 95 ml acetonă + 5 ml apă distilată sau în 59 ml butanol saturat.

Spoturile sînt colorate în nuanţă roşie-violacee.

c) *Revelatori specifici aldozelor:* oxalat de anilină, preparat din acid oxalic-anilină; 5 g acid oxalic este dizolvat în 98 ml acetonă sau butanol plus 2 ml anilină concentrată. Uscarea cromatogramei pulverizate se efectuează la temperaturi pînă la 80°.

d) *Revelatori specifici cetozelor.* Naftorezorcinolul în mediu acid se prepară prin amestecul de volume egale ale unei soluţii 0,2% naftorezorcinol în alcool 96%, cu o soluţie de 2% acid tricloracetic.

În determinările cantitative ale zaharurilor se foloseşte reactivul de 2% clorură trifeniltetrazoliu în alcool metilic + 0,5% NaOH. Cu acest reactiv, cromatograma se umectează în întregime şi se lasă timp de 60 de minute la 65°. Apoi petele sînt decupate şi eluate într-o soluţie de 20% acid acetic în alcool metilic. În aceste condiţii, coloraţia soluţiei se menţine timp de 14 zile.

5. *Identificarea spoturilor apărute.* Se face comparativ cu cromatograma, pe care s-au aplicat aminoacizii cunoscuţi. Prin acest procedeu de comparaţie se pot identifica componentele soluţiilor de cercetat. Pentru a avea 10—15 aminoacizi martori, determinaţi în aceleaşi condiţii, se utilizează harta cromatografică. Harta se poate efectua pe coli late de hîrtie de filtru (20—40 cm). În acest caz se pot pune atît soluţiile de cercetat, cît şi soluţiile etalon pe o singură hîrtie. Operaţiile sînt aceleaşi de la cromatograma efectuată pe o hîrtie de filtru lată de 4 cm (fig. 40).

6. *Metoda determinării cantitative.* Cromatografia pe hîrtie, fiind o metodă rapidă şi precisă de analiză calitativă, a pus imediat problema posibilităţii de elaborare a unei cromatografii cantitative. Eluţia petelor stă la baza metodei cantitative, metodă foarte răspîndită, fără a fi însă o metodă de mare precizie. Metoda densitometrică este mai puţin utilizată la analizele din laboratorul clinic.

Metoda eluţiilor. 1. Se depune pe hîrtia de filtru fiecare probă în dublu exemplar, iar după irigare se developează numai una din probe. Probele nedevelopate se identifică, prin comparaţie, cu nivelul spoturilor colorate. Spoturile nedevelopate sînt tăiate şi supuse eluţiei în apă distilată la temperatura laboratorului. Se agită de mai multe ori, iar în 15 minute proba este perfect eluată. Apoi eluţiile sînt tratate cu reactivul adecvat. Pe aceste probe se fac determinările la fotocolorimetru cu filtru special pentru analiza respectivă.

Curba-etalon se construieşte cu soluţii de concentraţii cunoscute din substanţe pure.

2. Metoda eluţiilor se mai poate executa şi în următoarea variantă :

Cromatograma mai întîi este developată cu reactivi obişnuiţi, iar după identificare petele sînt decupate şi introduse în eprubete foarte curate pentru eluare. Peste hîrtia decupată se adaugă cîte 3 ml reactiv, utilizat numai în analiza cantitativă. În cazul aminoacizilor se adaugă „ninhidrină clorură de cadmiu". Colorația maximă se obţine după 24 de ore la întuneric. Culoarea formată se extrage cu 3 ml alcool metilic. Extractul obţinut se citeşte la fotocolorimetru cu filtru 509 mμ.

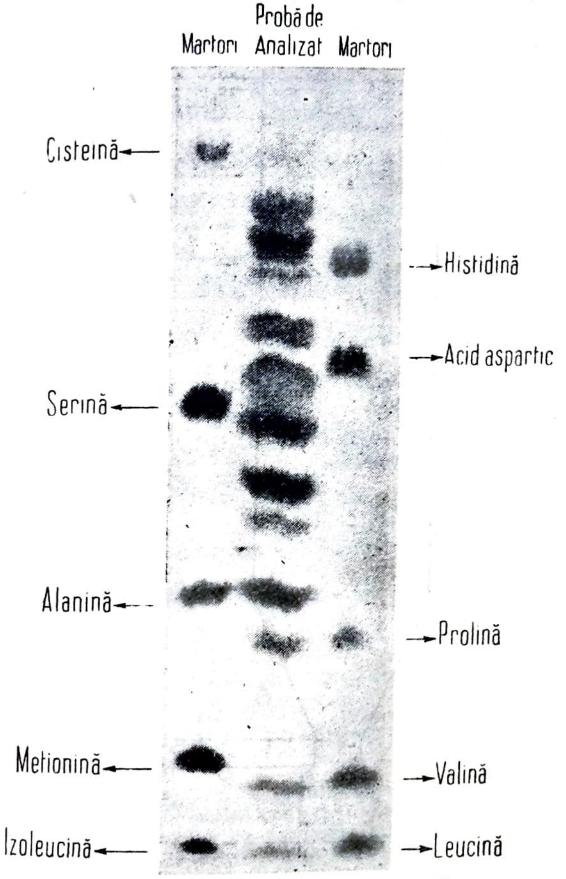


Fig. 40. — Cromatograma aminoacizilor.

7. *Aplicarea cromatografiei descendente* în practica de laborator.

a) *Sînge*. Prepararea serului pentru cromatografia aminoacizilor liberi. La 1 ml ser sau sînge se adaugă 1 ml apă, iar diluţia obţinută se precipită cu 10 ml acetonă sau alcool 96°. Apoi se agită şi se lasă să stea cîteva ore, iar precipitatul se separă prin centrifugare. Supernatantul se păstrează (I), iar precipitatul se spală prin centrifugare cu 5 ml acetonă. Supernatantul se adaugă la supernatantul I. Volumul final se tratează cu 25 ml cloroform. Prin agitare intensă se separă două straturi. La stratul de cloroform se adaugă încă 5 ml apă, amestecul se agită şi din nou se separă. Straturile apoase se reunesc şi se evaporă pînă la uscare. Reziduul se reia într-o cantitate foarte mică cu alcool izopropilic 10%.

Cu serul astfel tratat se pun în evidenţă aminoacizi liberi. Pentru punerea în evidenţă a aminoacizilor totali, serul este supus hidrolizei acide (ClH 6N), timp de 24 de ore, la 100°.

În cazul sîngelui total sau al elementelor figurate din sînge, izolate prin anumite metode, se impune în prealabil o liză totală, iar apoi se prelucrează lizatul întocmai ca un ser.

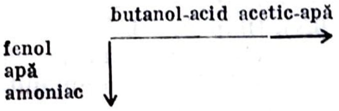
b) *Urina*, fiind săracă în unii aminoacizi, se impune a se lucra cu o cantitate de soluţie mai mare. Pentru aceasta, urina este concentrată prin dializă cu o soluţie de polivinilpirolidon 20%. Pentru îndepărtarea sărurilor se folosesc răşini schimbătoare de ioni. În acest caz se pun în evidenţă numai aminoacizi liberi.

Pe fişia de hîrtie de filtru, cu lăţime de 6 cm şi lungime de 20—50 cm, se aplică, la distanţă de 6 cm de la capătul hîrtiei, cîte 0,01 ml din soluţia de analizat, cu ajutorul unei micropipete. Pentru a obţine rezultate bune se recomandă să se depună cantitatea de 0,01 ml soluţie într-o pată circulară mică. După uscarea spoturilor, hîrtia de filtru se introduce cu capătul superior în jgheabul de sticlă care conţine lichidul de irigare [soluţie saturată butanol — acid acetic — apă (50 :10 :40) sau fenol-apă (1 :1)]. Se fixează hîrtia cu baghete de sticlă. Se lasă să irige, menţinînd temperatura constantă şi o atmosferă saturată cu vaporii lichidului de irigare. În timpul irigării, lichidul antrenează în direcţie descendentă aminoacizii din soluţia depusă la punctul de plecare. După 15 ore, fişiile de hîrtie sînt scoase din aparatul de cromatografie, uscate în etuvă (105—110°) şi pulverizate pentru „identificare" cu lichidul de developare adecvat, de exemplu, soluţie de ninhidrină 0,1% în butanol pentru aminoacizi. În cursul uscării la etuvă, etapa care urmează developării, apar petele colorate caracteristic pe fondul alb al hîrtiei.

B. *Metoda cromatografiei bidimensionale*

Cromatografia de tipul celei descrise, efectuată într-o singură direcţie, numită „cromatografia unidimensională'', este completată de „cromatografia bidimensională'' în care caz se utilizează două lichide de irigare şi o cantitate dublă de analizat faţă de cromatografia unidimensională.

Pentru cromatograma bidimensională se procedează astfel: hîrtia cu probele de analizat este întîi irigată într-o direcţie în butanol-acid acetic, apoi cromatograma este uscată şi pentru a doua oară este supusă la irigat, într-un alt solvent cu fenol — apă — amoniac, în direcţie perpendiculară pe prima.



Utilizarea cromatografiei bidimensionale permite separarea unor componente care, într-unul din lichidele de irigare, au valorile R_f foarte apropiate, astfel că spoturile lor se suprapun şi împiedică identificarea.

C. *Metoda cromatografiei ascendente*

Diferenţa dintre cromatografia ascendentă şi cea descendentă constă în faptul că circulaţia dizolvantului prin hîrtie se face prin capilaritate. De aici rezultă şi o simplificare a vasului, prin suprimarea jgheabului şi a suportului, deoarece faza mobilă se introduce într-o capsulă pe fundul vasului.

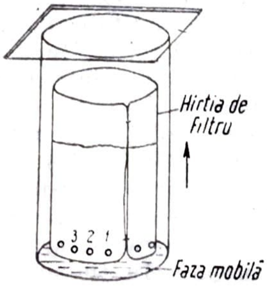


Fig. 41. — Cromatografia ascendentă.

Coala de hîrtie de filtru pe care se aplică probele numerotate 1, 2, 3,... se rulează în formă de cilindru, iar capetele se cos sau se prind în capse. Se pot introduce mai mulţi cilindri într-un singur vas.

Uscarea şi developarea se face ca mai sus.

O variantă comodă a cromatografiei ascendente o constituie metoda lui Mathias. Ea constă în tăierea hîrtiei de filtru după modelul şi dimensiunile indicate în figura 42. Banda de hîrtie este suspendată pe o baghetă de sticlă.

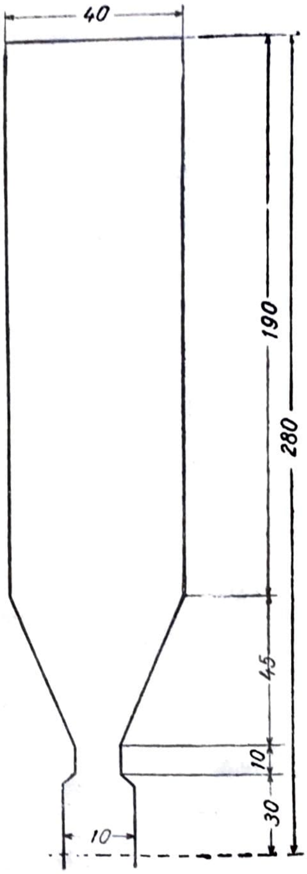


Fig. 42. — Schema benzii de hîrtie în metoda ascendentă după Mathias.

Partea inferioară este cufundată în irigant, pe o adîncime de 6—8 mm.

Substanţa de separat se aplică la începutul porţiunii înguste a benzii.

Solventul urcă prin capilaritate, trece prin porţiunea cea mai îngustă, unde substanţele de separat se tasează, şi apoi se răspîndesc în porţiunea lată sub formă de spoturi liniare (fig. 42 şi 43).

În acest sistem, irigarea se face minimum 24 de ore. Pentru o separare bună a aminoacizilor din ser se irigă banda 24 de ore după care se scoate, se usucă şi se irigă din nou 24 de ore. În aceste condiţii se obţin spoturi bine delimitate.

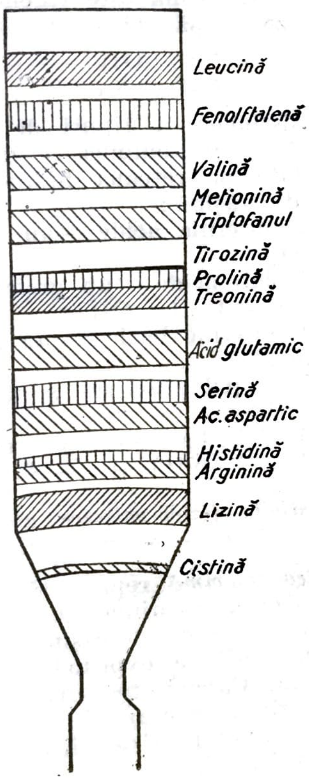


Fig. 43. — Reprezentarea schematică a poziţiei aminoacizilor în cromatografia ascendentă după Mathias.

D. *Metoda cromatografiei circulare*

Se bazează pe migrarea radială, în toate direcţiile, a petei de substanţă, aplicată la mijlocul hîrtiei. Din rondela de hîrtie se taie o fişie, pornind de la margine înspre centru. Fişia se îndoaie ca vîrful unei pioneze spre fundul capsulei, unde se găseşte lichidul de irigare (c). Cromatografia se execută între două cristalizoare suprapuse (b) (v. fig. 44). În locul fişiei care poate uneori provoca neregularităţi geometrice ale cromatogramei se poate utiliza un fitil de hîrtie, introdus în mijlocul rondelei pentru cromatografie.

Metoda este deosebit de comodă, putînd fi executată şi cu două plăci Petri suprapuse. Este avantajoasă cînd se execută separarea unor componente puţin numeroase dintr-un amestec.

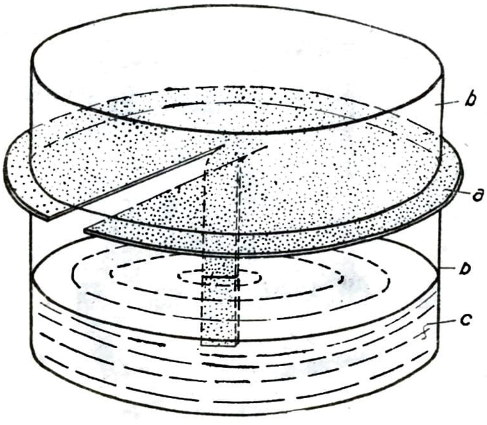


Fig. 44. — Dispozitiv pentru cromatografia circulară.

Cînd se cere separarea unor amestecuri mai complexe, care necesită suprafeţe mai mari de separare, se pot utiliza exicatoare cu diametrul de 25—30 cm.

E. *Metoda electrocromatografiei*

Constă în aplicarea unui curent electric de intensitate mare pe marginile laterale ale unei cromatograme, irigată descendent. În felul acesta, pe lîngă separarea pe baza coeficientului de repartiţie, intervine şi cîmpul electric, care determină migrarea componentelor care se separă cromatografic spre electrodul pozitiv sau negativ. În cazul substanţelor proteice se obţin separări foarte bune de acizi aminaţi şi de polipeptide.

Petele obţinute cu acest sistem au fost denumite *amprente digitale.*

Metoda necesită aparataj special. Reprezentăm în figura 45 montajul maghiar pentru electrocromatografie, tip „Labor".

Hîrtia se introduce în interiorul unui dulap special (1), iar de-a lungul ei se instalează electrozii respectivi (2). Se execută irigarea cu solventul ales şi în acelaşi timp se aplică un curent electric de voltaj şi amperaj ridicat, cu ajutorul aparatului (3), controlînd caracteristicile curentului pe indicatorul şi butonul voltmetric (4) şi miliampermetric (5).

Sistemul poate fi întrebuinţat şi pentru executarea electroforezei în sistemul vertical.

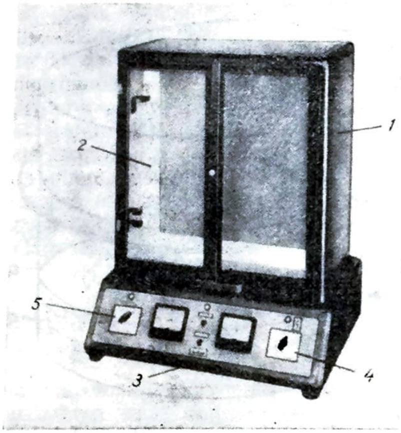


Fig. 45. — Dispozitiv tip Labor (R.P.U.) pentru electrocromatografie şi electroforeză în sistem vertical (explicaţii în text).

II. CROMATOGRAFIA PE RĂŞINI SCHIMBĂTOARE DE IONI

Principiu. Se înţelege prin *schimb ionic,* schimbul reversibil de ioni, între o fază solidă şi una lichidă, fără ca în structura fazei solide să apară schimbări esenţiale. Faza solidă este reprezentată prin particula de răşină, reţea tridimensională de hidrocarbură, pe care se grefează un mare număr de grupe ionizabile. Cele mai utilizate reţele de acest gen sînt copolimerii stirenului şi divinilbenzenului.

Natura grupelor ionizabile fixate pe răşină — variabilă după tipul respectiv — determină comportarea chimică a materialului.

Principial distingem două tipuri de schimb ionic:

A. *Răşinile cationice.* Lucrează după modelul:

$$R^{-}-H^{+}+Na^{+}Cl^{-} - - - R^{-}-Na^{+}+H^{+}Cl^{-}$$

$$R^{-}-H^{+}+Na^{+}OH^{-} - - - R^{-}-Na^{+}+H_2O$$

În acest caz, răşina este regenerată cu soluţii de acizi, după schema:

$$R^{-}-Na^{+}+H^{+}Cl^{-} - - - R^{-}-H^{+}+Na^{+}Cl^{-}$$

B. ***Răşinile anionice.*** Lucrează după modelul:

$$R^{+}-OH^{-}+Na^{+}Cl^{-} - - - R^{+}-Cl^{-}+Na^{+}OH^{-}$$

$$R^{+}-OH^{-}+H^{+}Cl^{-} - - - R^{+}-Cl^{-}+H_2O$$

În acest caz, răşina este regenerată cu soluţii de baze, după schema:

$$R^{+}-Cl^{-}+Na^{+}+OH^{-} - - - R^{+}- \\ -OH^{-}+Na^{+}Cl^{-}$$

Practic distingem 4 tipuri de schimbători ionici, după natura chimică a grupelor ionizabile, grefate pe reţeaua hidrocarbonată a particulei de răşină:

1. Răşini puternic acide — au grefate gruparea $[HSO_3^{-}]$.
2. Răşini slab acide — au grefate grupările $[-COOH]$ şi $[-C_6H_5-OH]$.
3. Răşini puternic bazice — au grefate grupările $[-N^{+}(CH_3)_3]$, $[-N^{+}(CH_3)_2(CH_2C_6H_5)]$ şi $[-N^{+}(CH_3)(CH_2C_6H_5)]$
4. Răşini slab bazice — au grefate grupările $[-NH_2]$, $[-NH]$ şi $[-N=]$.

Caracteristicile fizico-chimice ale răşinilor schimbătoare de ioni

Capacitatea maximă reprezintă numărul de grupări ionizate, exprimat pe unitatea de greutate sau volum al răşinii. Capacitatea maximă „uscată" se exprimă în mEq/g de răşină uscată. Capacitatea maximă a răşinii umede reprezintă numărul de grupări ionizate pe unitatea de volum a răşinii în apă şi se exprimă în mEq/ml.

Capacitatea maximă sau totală reprezintă limita superioară a capacităţii de schimb a răşinii respective.

Capacitatea de lucru reprezintă fracţiunea din capacitatea maximă care este utilizată în practica unei operaţii de schimb ionic. Ea se exprimă prin raportul dintre cantitatea ionilor scoşi din materialul de lucru şi volumul răşinii din coloană.

Patul de răşină reprezintă volumul conţinut în coloană.

Selectivitatea răşinii — definită prin coeficientul de selectivitate $[K_c]\frac{A}{B}$ — este reprezentată de raportul:

$$K_c\frac{A}{B} = \\ = \frac{[\text{conc. ionului A în răşină}] \times [\text{conc. ionului B în soluţie}]}{[\text{conc. ionului B în răşină}] \times [\text{conc. ionului A în soluţie}]}$$

Dimensiunea particulei de rășină reprezintă diametrul sferei respective care variază între 0,04 și 1,00 mm. Cu cît acest diametru este mai mic, cu atît timpul necesar pentru echilibrarea rășinii cu soluția este mai mic.

Dăm în tabelul 43 caracteristicile principale ale unor rășini utilizate în laborator.

TABELUL 43

Caracteristicile principale ale unor rășini schimbătoare de ioni

Denumirea rășinii	Producător	Scheletul rășinii	Grupele active	Aciditatea	Capacitatea totală	
					mEq/g	mEq/ml
KY–1	U.R.S.S.	Acid fenol-sulfonic	$-SO_3H$	Puternic acidă	5,61	—
KG–1	U.R.S.S.	Acid metacrilic	$-COOH$	Slab acidă	10	—
Amberlit IR 120	Rohm & Haas Co.	Polistiren	$-SO_3H$	Puternic acidă	4,2	1,9
Amberlit IRC 50	Rohm & Haas Co.	Acid polimetacrilic	$-COOH$	Slab acidă	10,0	3,8
Amberlit IR 200	Rohm & Haas Co.	Polistiren	$-SO_3H$	Puternic acidă	—	1,75
Dowex 50 W	Dow. Co. U.S.A.	,,	$-SO_3H$	Puternic acidă	5,0	1,7
Dowex 50	Dow. Co. U.S.A.	,,	$-SO_3H$	Puternic acidă	5,2	1,9
Lewatit S 100	Bayer	,,	$-SO_3H$	Puternic acidă	4,75	2,26
Lewatit CNO	,,	Acid metacrilic	$-COOH$	Slab acidă	10,0	—
Schimbător de ioni I	Merck	Polistiren	$-SO_3H$	Puternic acidă	4,5	1,4
Schimbător de ioni IV	,,	Acid poliacrilic	$-COOH$	Slab acidă	10,0	4,2
Mykion PS	R.P.U.	Polistiren	$-SO_3H$	Puternic acidă	4,0	1,57
AB–15	U.R.S.S.	Polistiren	$-[N(CH_3)_3]^+$	Puternic bazică	3,10	—
AH–20	,,	,,	$-NH_3$	Mediu bazică	5,5	1,9
Amberlit IRA 400	Rohm & Haas Co.	,,	$-[N(CH_3)_3]^+$	Puternic bazică	3,0	1,4
Amberlit IRA 410	Rohm & Haas Co.	,,	$-[N-R_2R_1]^+$	Puternic bazică	3,0	1,1
Amberlit IR 4 B	Rohm & Haas Co.	Polietilenă	$-NHR_1-NH_2$	Slab bazică	10,0	2,5
Dowex 1	Dow. Co.U.S.A.	Polistiren	$-[N(CH_3)_3]^+$	Puternic bazică	3,5	1,4
Dowex 2	,,	,,	$-[NR_2R_1]^+$	Puternic bazică	3,5	1,4
Dowex 3	,,	,,	$-NH_2$	Slab bazică	3,5	1,33
Lewatit MN	Bayer	,,	$-[NR_2R_1]^+$	Puternic bazică	2,4	0,68
Lewatit MIH	,,	,,	$-[NR_2]-NHe$	Mediu bazică	5,5	1,9
Schimbător de ioni II	Merck	,,	$-NHR_1-NH_2$	Slab bazică	—	1,2
Schimbător de ioni III	,,	,,	$-[NR_2R_1]^+$	Puternic bazică	—	0,55
Mykion G	R.P.U.	,,	$=NH$	Mediu bazică	4,6	1,25

Modul de lucru cu rășinile schimbătoare de ioni

Principial există 3 tipuri de operații în schimbul ionic:

1. *Metoda amestecării rășinii* cu soluția într-un tanc, în care se stabilește echilibrul prin agitare continuă. Soluția se filtrează și rășina este preparată pentru un nou ciclu operator. În general, în această metodă nu se utilizează decît o mică parte a capacității totale de schimb a rășinii.

2. *Metoda coloanei*, este cea mai utilizată. Teoretic poate fi considerată ca un mare număr de operații de tipul anterior descris, repetate de un număr mare de ori. Practic, se utilizează cilindri verticali (coloana respectivă), umpluți cu rășina schimbătoare de ioni. La capătul inferior al cilindrului, rășina se sprijină pe un filtru (vată de sticlă, vată obișnuită, perle de sticlă etc.).

Soluția care urmează a fi trecută prin rășină, ca și soluțiile de regenerare, se introduc prin partea superioară a coloanei și sînt lăsate să curgă de-a lungul rășinii (mai rar se întrebuințează irigarea inversă).

Lichidele care urmează a fi trecute prin coloană, nu trebuie să cuprindă materiale insolubile, deoarece coloana de rășină este în fond un filtru, care poate fi colmatat de precipitate.

3. *Metoda rășinii mobile.* În această metodă, atît rășina cît și soluțiile sînt amestecate permanent într-un sistem care constă din două etaje, în care rășina, soluția de tratat și regenerantul circulă continuu, în contracurent, de la un etaj la altul. Este utilizată în special pentru scopuri industriale (desalinizarea apelor).

Prepararea coloanei de rășină

Drept coloane se pot întrebuința și biurete simple, de la 25 la 100 ml, cu robinet.

Pentru scopuri speciale se confecționează din sticlă, coloane anume făcute, cu diametre bine precizate.

În general, raportul dintre înălțimea patului coloanei și diametrul său variază după tehnica de lucru și este dată o dată cu metoda respectivă.

Măsurarea înălțimii stratului de rășină din coloană se face în forma ionică în care este livrată rășina.

Primul timp în prepararea coloanei de rășină îl reprezintă trecerea acesteia într-un cilindru și acoperirea cu apă bidistilată. Se lasă să sedimenteze, se îndepărtează excesul de lichid și se repetă operația de cîteva ori. Ultima decantare se face de așa manieră încît rășina să rămînă sub forma unei suspensii groase. Se umple apoi coloana, trecînd sferele de rășină din cilindru, cu un jet de apă bidistilată. În timpul acestei manopere trebuie evitată cu grijă apariția bulelor de aer în coloană. După umplerea coloanei cu rășină, aceasta trebuie să rămînă acoperită cu un strat de lichid.

Ciclul tip de operații — la cromatografierea pe coloane schimbătoare de ioni

Timpul 1 — epuizarea rășinii. Se trece soluția probei de lucru de-a lungul coloanei de rășină, preparată în modul descris. Lichidul se culege la capătul inferior al coloanei. În decursul acestei operații, anumiți ioni specifici din soluția noastră sînt îndepărtați prin schimbarea lor cu o cantitate echivalentă de ioni din rășină.

Timpul 2 — curățarea rășinii. Se face în cazul cînd lichidul de cercetat este în cantitate mică și de valoare biochimică mare. În acest caz, pentru a nu avea nici un fel de pierderi a lui în patul rășinii, la sfîrșitul timpului de epuizare se introduce o spălare cu apă bidistilată. Aceasta se introduce prin partea superioară a biuretei-coloană și se culege la capătul ei.

Timpul 3 — spălarea inversă. Se introduce un curent invers de lichid, prin presiune, la capătul inferior al biuretei. Se lasă apoi din nou rășina să sedimenteze, iar excesul de lichid se elimină prin scurgere. Spălarea inversă curăță rășina de contaminanții insolubili și o descompactează, împiedicînd tasarea ei.

Timpul 4 — regenerarea rășinii. Se trece de-a lungul patului rășinii soluția unui regenerant specific. Prin această operație, rășina este regenerată la forma sa inițială și poate fi reutilizată pentru un nou ciclu de operații.

Timpul 5 — spălarea rășinii. Rășina este spălată de soluția de regenerare, prin trecerea de-a lungul coloanei, a unui volum determinat de apă bidistilată.

Dăm în tabelul 44 modul practic de regenerare a rășinilor tip Dowex și Amberlit.

Utilizările rășinilor schimbătoare de ioni în laboratorul clinic

Utilizarea cea mai comună a rășinilor schimbătoare de ioni este la demineralizarea soluțiilor și a lichidelor biologice. Cu foarte mare randament și eficacitate se obține pe coloană apa complet demineralizată, întrebuințată în special la tehnicile de enzimologie și la prepararea tampoanelor. De asemenea se obțin rezultate foarte bune în deionizarea prealabilă a unor lichide biologice ca lichidul cefalorahidian, urină, suc gastric, pentru a fi supuse separărilor de proteine prin electroforeză sau cromatografie pe hîrtie.

III. CROMATOGRAFIA PE COLOANĂ DE GEL — TIP DEXTRAN

Principiu. Acest tip modern de cromatografie extrem de răspîndit în laboratoare în ultimii ani utilizează drept suport granulele hidrofilice ale unor polizaharide (dextran, agar-agar etc.). Rețeaua suportului prezintă un caracter neionic, proprietățile polare fiind datorite în întregime conținutului mare de grupări hidroxil. Dacă se lasă să treacă o soluție salină prin acest gel, ea va difuza liber de-a lungul rețelei de granule. În cazul soluțiilor cu molecule mai mari, acestea vor fi reținute în rețeaua gelului, în funcție de porozitatea acesteia și de dimensiunile moleculelor respective. Proprietatea ge-

TABELUL 44

Tehnica regenerării răşinilor tip Dowex şi Amberlit

Tipul răşinii	Dowex 1	Dowex 2	Dowex 3	Dowex 21K	Dowex 50	Amberlit IRA	400 Amberlit IRA 410	Amberlit IRC 50	Amberlit IR 120	Amberlit IR 200
Soluţia de regenerant	NaOH 8 %	NaOH 4 %	NaOH 2 %	NaOH 4 %	HCl 7,5 %	NaOH 4–8 %	NaOH 2–4 %	HCl 1 % NaCl 10 %	HCl 1 % NaCl 10 %	HCl 10 % NaCl 10 %
Volumul de regenerant (volum soluţie/volum răşină)	3/1	4/1	8/1	2/1	4/1	3–6/1	6–8/1	2–4/1	3–5/1	2–4/1
Durata regenerării (minute)	30	30	30	30	30	30	30	30–60	30	30
Volumul apei de spălare (volum H_2O/volum răşină)	7/1	6/1	10/1	10/1	5/1	8–10/1	8–10/1	8–15/1	10–15/1	10–12/1
Viteza de spălare (m/oră)	5	5	5	5	5	3–5/1	3–5/1	2–4/1	3–5/1	3–5/1

lurilor de dextran de a exclude din soluţii moleculele de dimensiuni mari şi de a fi permeabile pentru moleculele de dimensiuni mici, formează principiul metodei de cromatografie pe coloană de gel.

Metoda poate fi aplicată atît soluţiilor ionizate, cît şi celor neionizate.

Se numeşte coeficient de distribuţie — notat K_D — raportul de distribuire a soluţiei respective dintre apa din granulele gelului şi apa extragranulară.

Dacă $K_D = 0$, substanţa cromatografiată va fi complet exclusă din granulele gelului.

$0 < K_D < 1$ substanţa va fi parţial exclusă.

$K_D > 1$ substanţa va fi adsorbită pe matricea gelului.

Să introducem în coloana de cromatografie, o soluţie cu $K_D = 0$ şi una cu $K_D = 1$. Soluţia $K_D = 0$ va apărea în eluant după volumul V_o. După adăugarea unui volum V_i va apărea şi substanţa neexclusă, ambele păstrînd raportul concentraţiilor iniţiale (fig. 46 *a*). După volumul V_o, soluţia exclusă va înceta a mai apărea în eluant, iar soluţia parţial exclusă, după volumul $V_o + V_i$ (fig. 46 *b*). Dacă volumul probei este mai mic decît V_i este posibilă o separare completă a soluţiilor (fig. 46 *c*).

Ecuaţia generală a apariţiei unei soluţii în eluant — după cromatografierea pe o coloană de gel — tip dextran — devine deci:

$$V = V_o + K_D V_i$$

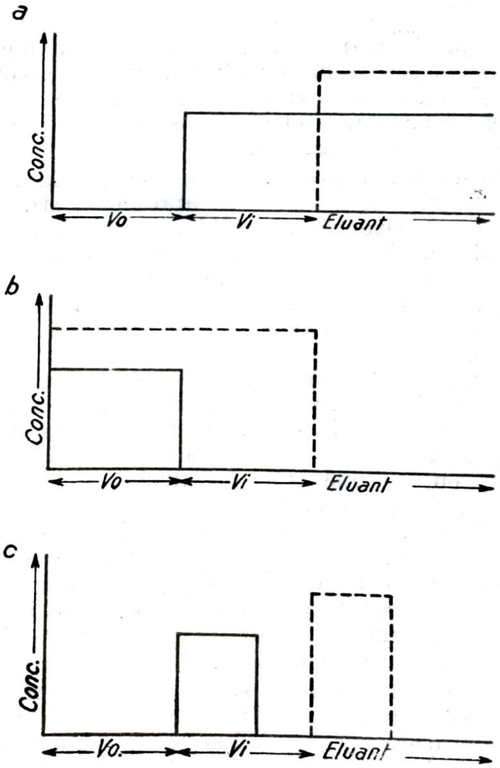


Fig. 46. — Principiul cromatografiei pe coloană de gel (dextran).

Modul practic de lucru la cromatografia pe coloană de gel tip dextran

Dăm în cele ce urmează modul practic de cromatografiere pe o coloană de dextran, tip Sephadex.

Pregătirea coloanei. Se cîntărește o cantitate de gel uscat, variind între 0,5 și 2 g pentru o coloană, și se introduce într-un cilindru, unde este agitată cu un agitator magnetic, într-o soluție slab salină.

Se poate întrebuința cu rezultate bune soluția 0.01 N Tris-0.004 N acid succinic, pH =7.6. Se lasă particulele mari să sedimenteze, iar supernatantul se îndepărtează. Se spală în același mod cu apă distilată. Se adaugă aproximativ 10 ml apă distilată, se barbotează bine cu o pipetă și se introduce în coloana de cromatografie, care are pe fund un suport de vată obișnuită sau vată de sticlă. (Se poate utiliza și o simplă pipetă de 10 ml terminată printr-un tub subțire de cauciuc, care poate fi închis cu o clemă).

După formarea unui strat de aproximativ 4—5 cm se deschide robinetul inferior al coloanei și se lasă încet să se scurgă apa. Coloana este bine preparată, cînd stratul superior al gelului apare perfect orizontal.

Introducerea probei. Cînd apa distilată s-a scurs din coloană pînă în apropierea stratului superior orizontal al gelului se închide robinetul inferior (sau clema respectivă) și se introduce prin partea superioară, cu o pipetă, volumul soluției de cromatografiat. Se deschide robinetul și se culege proba. Cînd nivelul probei a ajuns foarte aproape de extremitatea superioară a coloanei de gel se închide robinetul inferior și se introduce primul volum de eluant. Se deschide robinetul și se culege prima probă eluată într-o nouă eprubetă. Se repetă operațiile, cu volume fixe de eluant, aplicate în concentrații crescînde (metoda se numește a eluțiilor treptate). Se obține astfel un număr de eprubete, cu volum fix, în care se determină fracțiunile căutate. Metoda poate fi aplicată în orice laborator, putînd fi colectate în acest sistem un număr oricît de mare de fracțiuni, eluate de pe coloane de gel.

Colectarea fracțiunilor. Sistemul descris mai sus are avantajul că nu necesită nici un fel de aparatură specială. Cînd se cere însă colectarea unui mare număr de fracțiuni dintr-un volum mare de eluant, operațiile sînt foarte lungi, necesitînd prezența permanentă a unui tehnician. Pentru a se înlătura aceste dezavantaje s-au construit aparate automate de colectat.

Principiul de funcționare a unui asemenea aparat este ilustrat de aparatul tip Stein și Moore (fig. 47): coloana (1) este umplută în permanență cu soluție de eluant, în concentrații crescînde, printr-un sistem special. Picătura care se scurge de la capătul inferior al coloanei în eprubetă, trece prin fața unei celule fotoelectrice (3), legată cu un numărător automat de picături (4). Cînd în eprubeta respectivă (5) a căzut numărul de picături corespunzător volumului ce dorim să-l recoltăm pe fracțiune, dispozitivul automat (4) rotește masa rotativă pe care sînt montate eprubetele și o eprubetă nouă vine în dreptul coloanei (1).

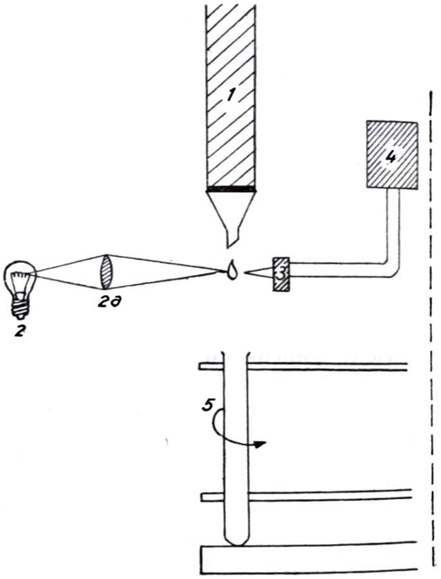


Fig. 47. — Dispozitiv pentru colectarea fracțiunilor (după Moore și Stein).

1 — coloană cromatografică; 2 — sursă de lumină; 2a — lentilă; 3 — celulă fotoelectrică; 4 — numărător de picături; 5 — eprubetă montată pe masa rotativă.

În felul acesta se pot colecta fracțiuni de cîte 10 ml, de exemplu, dintr-un volum de 1 litru eluant.

Utilizarea cromatografiei pe coloană de gel în laboratorul clinic

Tipul de cromatografie descris are o largă aplicabilitate în biochimie. El poate fi aplicat la separarea și purificarea enzimelor, la separarea acizilor nucleici, a polipeptidelor, acizilor aminaţi, polizaharidelor etc.

În laboratorul clinic, cromatografia pe o coloană de dextran poate fi utilizată la separarea proteinelor serice, la eliminarea din urină a unor substanţe care pot interfera cu tehnicile de determinare a produselor utilizate în *clearance* (de exemplu, cromatografierea urinii pentru *clearance* la insulină în cazul diabeticilor), la separarea proteinelor din sucul gastric, L.C.R. etc.

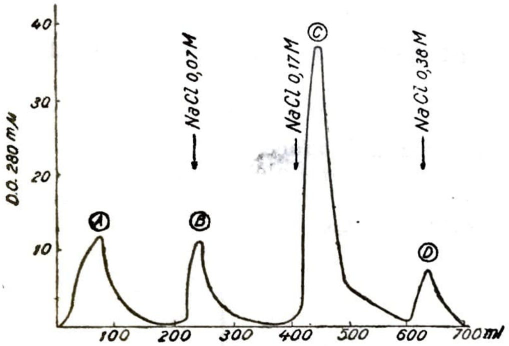


Fig. 48. — Fracţionarea proteinelor serice pe o coloană de dextran.

Dăm în cele ce urmează ***tehnica de separare a proteinelor serice***, pe gel de Sephadex :

Se face în prealabil o trecere a serului pe o coloană de Sephadex, care execută o desalinizare a probei respective. Pentru aceasta se prepară după tehnica dată o coloană de 1 g Sephadex sau o răşină schimbătoare de ioni în tampon fosfat de Na 0,02 M pH = 6,6 şi se trec prin ea 3 ml ser.

Se prepară o nouă coloană de Sephadex — DEAE — substituit cu dietilaminoetanol, care reţine proteinele. Coloana se prepară în acelaşi tampon şi se cromatografiază cei 3 ml ser, trecuţi prin prima coloană. Eluţia se face cu NaCl în concentraţii crescînde, modificînd concentraţia la diferite intervale (metoda eluţiilor treptate).

Reprezentăm în figura 48 curba fracţionării proteinelor serice obţinută în aceste condiţii. Determinarea concentraţiei de proteină în fracţiunile colectate se face prin absorbţia specifică în ultraviolet (λ = 280 mμ).

IV. CROMATOGRAFIA PE COLOANĂ DE CELULOZĂ

Principiu. Celuloza este o reţea macromoleculară, hidrofilă, prezentînd în toate cele 3 dimensiuni grupări oxidrilice, care pot fi substituite cu alte grupe ionizabile.

Asemenea celuloze substituite s-au utilizat în ultimii ani cu succes, pentru separarea macromoleculelor biologice din amestecuri.

Superioritatea celulozelor substituite faţă de toate celelalte tipuri de suporturi cromatografice se datoreşte numărului mare de grupe ionizabile din structură, distanţei relativ mari dintre acestea şi în plus capacităţii lor de a contracta legături de hidrogen.

Aceste calităţi permit o separare mai netă a diverselor substanţe din amestec, permiţînd o îmbogăţire relativă a componentelor de studiat, pînă la 50—100 de ori la o singură trecere prin coloană.

Modul practic de lucru la coloanele cu celuloză substituită este în principiu acelaşi cu cel descris la coloanele de gel tip dextran.

Dăm în tabelul 45 principalele tipuri de celuloze substituite şi caracteristicile lor.

TABELUL 45

Principalele tipuri de celuloze substituite şi caracteristicile lor

Denumirea celulozei	Gruparea activă	Aciditatea	Aplicaţii
DEAE-celuloză (dietil-aminoetil-celuloză)	$-O \cdot C_2H_4 \cdot N(C_2H_5)_2$	Puternic bazică	Cea mai utilizată.
AE-celuloză [aminoetilceluloză]	$-O \cdot C_2H_4 \cdot NH_2$	Bazică	La fracţionări de proteine serice, separări de enzime, purificări etc.
GE-celuloză [guanidoetilceluloză]	$-O \cdot C_2H_4 \cdot NH \cdot C = NH_2 \cdot NH_2^+ Cl^-$	Puternic bazică	Aceleaşi. Fracţionarea proteinelor în special de tip globulinic.
PAB-celuloză [paraaminobenzil-celuloză]	$-O \cdot CH_2 \cdot C_6H_1\ NH_2$	Bazică	Separări şi purificări de proteine, enzime, acizi nucleici.
CM-celuloză [carboximetilceluloză]	$-O \cdot CH_2 \cdot COOH$	Acidă	Fracţionarea proteinelor bazice.
P-celuloză [celuloză fosforilată]	$-O \cdot PO_3H_2$	Puternic acidă	Foarte utilă la fracţionarea proteinelor bazice şi a complexelor cu metale grele.

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A FUNCȚIEI DE DIGESTIE ȘI A METABOLISMULUI

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A STOMACULUI

Sucul gastric este un lichid limpede, transparent, cu reacție acidă, provenit din secreția unei varietăți de celule din mucoasa gastrică. Celulele epiteliului parietal secretă în special acidul clorhidric. Celulele mucoase ale glandelor gastrice și celulele peptice secretă în special bicarbonați și cloruri, care tamponează aciditatea acidului clorhidric.

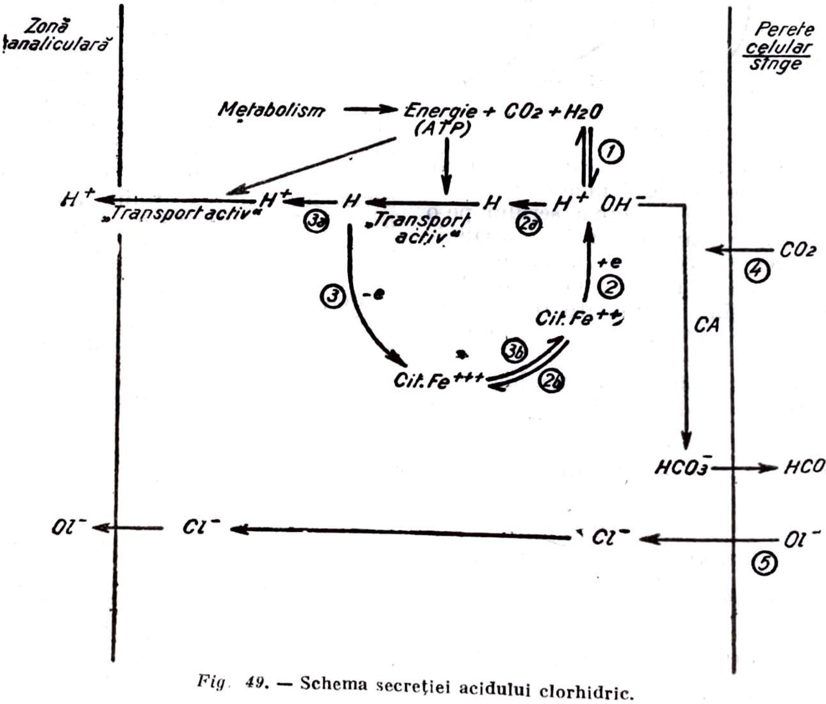

Zonă canaliculară
Perete celular sînge
Metabolism
Energie + CO2 + H2O
(ATP)
①
H+
„Transport activ"
H+
H
3a
„Transport activ"
H
2a
H+ OH−
CO2
④
+e
②
③
−e
Cit. Fe++
CA
3b
Cit. Fe+++
2b
HCO3−
HCO3−
Cl−
Cl−
Cl−
Cl−
⑤

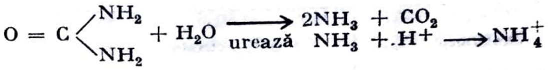
Fig. 49. — Schema secreției acidului clorhidric.

Mecanismul producerii acidului clorhidric de către celulele parietale este înfățișat în figura 49. Metabolismul intermediar al organismului furnizează energie, CO_2 și H_2O. În apropierea peretelui celular, apa se disociază în H^+, OH^- (1), iar ionul de hidrogen oxidează ionul Fe^{++} al citocromului, luîndu-i un electron (2). Ca urmare, H^+ se transformă în atom de hidrogen

H (2 *a*), iar ionul feros Fe^{++} trece în ion feric Fe^{+++} (2 *b*). Atomul de H este transportat spre zona canaliculară, unde atinge o concentrație ridicată.

Deplasarea H se face printr-un mecanism biologic special, numit „transport activ”, care se desfășoară cu cheltuială de energie, luată din metabolismul intermediar, prin intermediul donatorului energetic universal ATP. La acest nivel, atomul de hidrogen reduce ionul feric al citocromilor, cedîndu-i un electron (3). Atomul de H se transformă în ion H^+ (3 *a*), iar ionul feric se retransformă în ion feros Fe^{++} (3 *b*). Prin același mecanism al transportului activ H^+ este deplasat în zona canaliculară. O dată cu acest fenomen, o moleculă de CO_2 din sînge cuplează la nivelul peretelui celular oxidrilul rămas liber (1), formînd, sub influența carboanhidrazei (CA), ionul de bicarbonat (4). Acesta trece în sînge, înlocuind un ion Cl (5), care se deplasează spre zona canaliculară și formează cu H^+ acidul clorhidric.

Cînd ionii de H^+ și Cl^- pătrund în concentrații prea ridicate, în celulele neparietale intră în joc un mecanism protector — ureaza — care la acest nivel se află în cantități mari, descompune ureea în NH_3 și CO_2; amoniacul formează apoi cu H^+, ionul NH_4^+ care este eliminat:



$$O=C\begin{matrix}NH_2\\NH_2\end{matrix} + H_2O \xrightarrow[\text{urează}]{} \begin{matrix}2NH_3 + CO_2\\NH_3 + H^+ \longrightarrow NH_4^+\end{matrix}$$

Este de remarcat că celulele mucoasei gastrice care nu sînt adaptate acidității pronunțate din zona celulelor parietale ar fi coagulate sau digerate de către pepsină, a cărei activitate în stomac este foarte intensă. Acest lucru nu se întîmplă, deoarece mucinele sucului gastric joacă un al doilea rol protector. Ele sînt secretate de către celulele mucoasei gastrice, care produc așa-numitul *mucus gastric*, și de către celulele mucoase ale glandelor gastrice, care produc așa-numita *mucoproteină gastrică solubilă*. Mucusul gastric poate fi digerat parțial și transformat în *mucoproteoză gastrică solubilă*. O parte din ea este precipitată de acidul clorhidric din stomac și transformată în mucus precipitat.

Mucoproteinele, mucoproteoza, mucusul gastric și mucusul precipitat alcătuiesc la un loc ceea ce Boyd și Glass numesc *mucina gastrică*.

Redăm în tabelul 46 activitatea digestivă a principalelor enzime din sucul gastric și modul lor de acțiune.

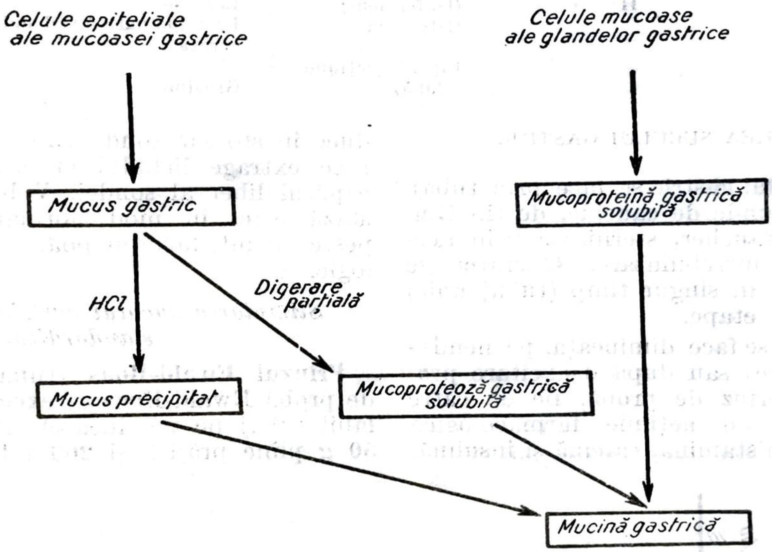

Celule epiteliale ale mucoasei gastrice
Celule mucoase ale glandelor gastrice
Mucus gastric
Mucoproteină gastrică solubilă
HCl
Digerare parțială
Mucus precipitat
Mucoproteoză gastrică solubilă
Mucină gastrică

Fig. 50. — Schema formării mucinei gastrice.

TABELUL 46

Activitatea digestivă a sucului gastric

Proferment	Activator	Enzima activă	Substratul digestiei	Rezultat
Pepsinogen	HCl H+ (Autocataliză prin urme pepsină)	Pepsina	Proteină nativă Proteină nativă şi denaturată	Proteină denaturată Proteoze Peptone
Prorenină (sugari)	H+	Renină (labferment)	Cazeină	Paracazeină
		Catepsina	Proteină nativă şi denaturată	Proteoze Peptone
		Lipază (acţiune slabă)	Grăsimi	Mono-şi digliceride

RECOLTAREA SUCULUI GASTRIC

Recoltarea sucului gastric se face prin tubaj, cu ajutorul unei sonde de cauciuc, de tip Einhorn sau de tip Faucher, sterilizată prin fierbere înainte de întrebuinţare. Operaţia se poate efectua într-un singur timp (tubaj unic) sau în mai multe etape.

Tubajul gastric se face dimineaţa, pe nemîncate, (*tubage à jeun*) sau după o excitare produsă, fie de un prînz de probă, fie de către diverse substanţe cu acţiune farmacologică adecvată : alcool, histamină, cafeină şi insulină.

Prînzurile de probă sînt standardizate, iar tubajul se efectuează abia cînd digestia stomacală a atins apogeul. S-au formulat mai multe tipuri de prînzuri de probă : prînzul Ewald-Boas, prînzul Boas, prînzul cu bulion Ziminoţki, prînzul cu varză Leporski, prînzul Leube-Riegel şi prînzul fictiv Carnot.

Tubajul pe nemîncate este indicat pentru cercetarea lichidului de stază. Bolnavului, nemîncat şi nebăut de cel puţin 12 ore, i se introduce în stomac sonda Einhorn sau Faucher şi i se extrage lichidul cu seringa adaptată la capătul liber al sondei. Volumul lichidului de stază este, în mod normal, de 30—40 ml; peste 50 ml, lichidul poate fi considerat patologic.

Stimularea sucului gastric prin prînzuri standardizate

Prînzul Ewald-Boas (tubajul după prînzul de probă Ewald-Boas se execută după un prealabil tubaj pe nemîncate). Prînzul constă din 50 g pîine prăjită şi 200 ml ceai, fără zahăr.

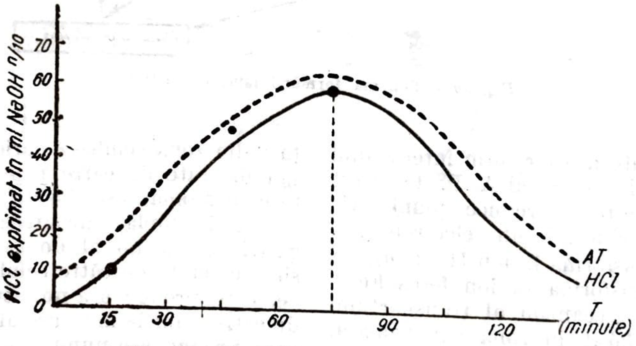


Fig. 51. — Curba activităţii izosecretoare.

În practică, după 45—60 de minute de la administrarea prînzului se face tubajul cu sonda Faucher. În mod normal, cantitatea extrasă nu depăşeşte 100 ml. O cantitate mai mare arată o hipersecreţie gastrică. Prînzul Ewald-Boas se practică rar, fiind înlocuit cu tehnici perfecţionate.

Proba Ewald-Boas pune în evidenţă 3 categorii de secretori : izosecretori, hiposecretori şi hipersecretori.

1. Izosecretorii prezintă o frecvenţă de 37%.

Aciditatea totală merge paralel cu aciditatea liberă. Aciditatea liberă apare de obicei la 18 minute, atinge maximul între 60 şi 75 de minute, cu valori de 40—60 ml NaOH N/10, coboară apoi treptat cu 10—15 ml NaOH N/10, pînă la 2—2 1/2 ore.

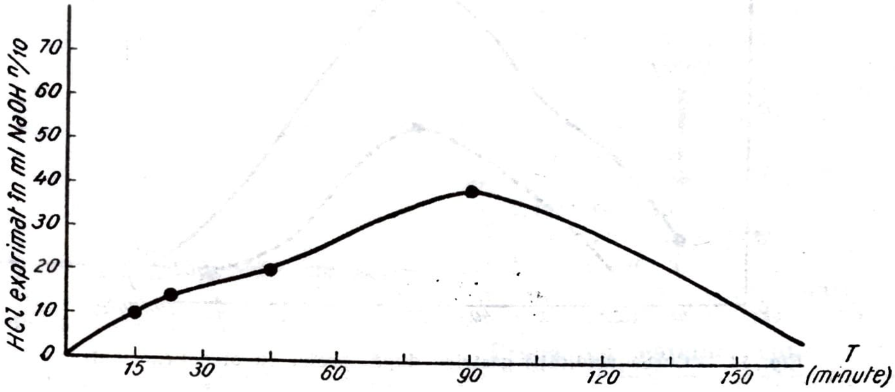


Fig. 52. — Curba activităţii hiposecretoare.

2. Hiposecretorii prezintă o frecvenţă de 30%.

Aciditatea liberă este absentă la început, creşte încet, evoluează plat, atingînd maximul între 30 şi 40 ml NaOH N/10 la 90 de minute, apoi scade foarte încet pînă la 2 ore.

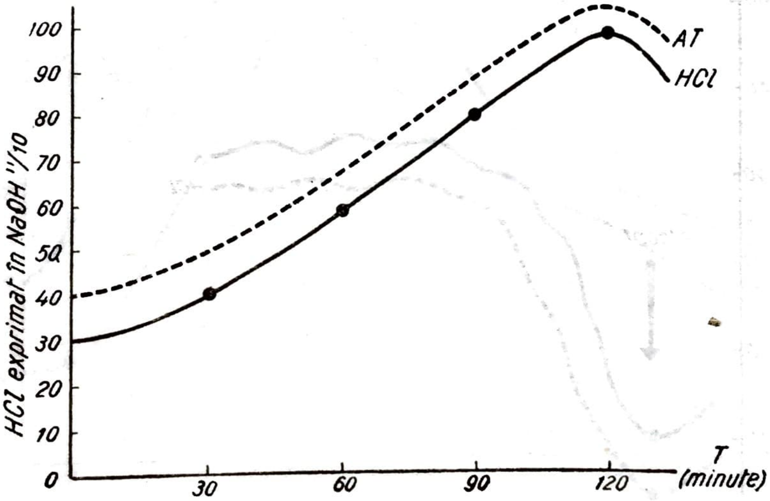


Fig. 53. — Curba activităţii hipersecretoare.

3. Hipersecretorii prezintă o frecvenţă de 33%.

Aciditatea liberă, prezentă de la început, creşte repede, atingînd un maximum la 2 ore, de 70—90 ml NaOH N/10, apoi scade lent.

Aciditatea totală merge paralel cu aciditatea liberă.

În figurile 51, 52 şi 53 sînt reprezentate grafic cele trei categorii de secretori. Recoltarea sucului gastric pentru construirea acestor curbe s-a făcut la intervale mici, timp de 120—150 de minute.

Stimularea sucului gastric cu substanţe farmacologice

Proba cu alcool se face după un prealabil tubaj pe nemîncate. Prin sonda Einhorn se introduc 300 ml apă alcoolizată 5% + 3 picături de soluţie de albastru de metilen 2%. După 30 de minute de la administrare se aspiră secreţia prin sondă, cu ajutorul unei seringi adaptate la capătul liber al sondei. Se practică fie o singură extracţie după o jumătate de oră, fie extracţii fracţionate din 10 în 10 minute, cîte 10 ml lichid, pînă la obţinerea unui suc gastric decolorat. Din acest moment se aspiră cu seringa din 15 în 15 minute întreg conţinutul stomacal, timp de 2 ore. În fiecare extracţie se determină aciditatea totală.

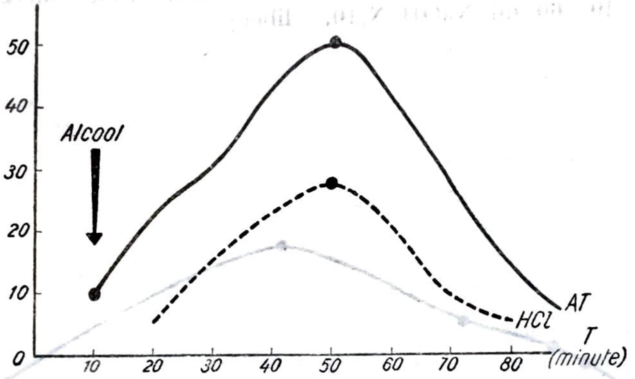


Fig. 54. — Curba acidităţii gastrice după proba cu alcool (normal).

În cazul normal, maximul de aciditate este între 40 şi 60 de minute, iar timpul de evacuare este între 80 şi 120 de minute.

Proba Leporski este proba cu alcool modificată, care aduce o serie de date mai precise decît proba iniţială.

Proba se face după un prealabil tubaj dimineaţa pe nemîncate, apoi se introduc prin sonda Einhorn 300 ml soluţie alcoolică 5%. După 25 de minute se evacuează din nou tot conţinutul gastric, care se cifrează la 70—80 ml. În continuare se fac 4 extracţii totale la intervale de cîte 15 minute. Suma cantităţilor ob-

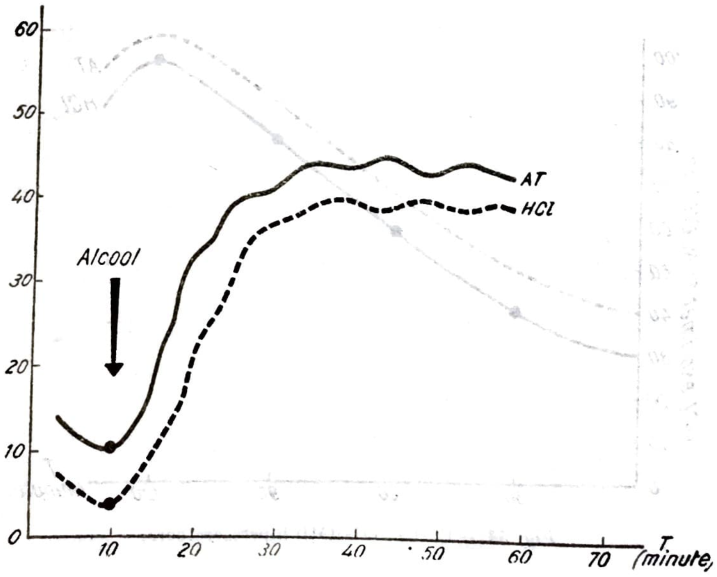


Fig. 55. — Curba acidităţii gastrice după proba cu alcool (curbă în platou).

ţinute constituie efortul secretor pe oră, care în stare normală este 70—80 ml. În fiecare din aceste probe se dozează acidul clorhidric

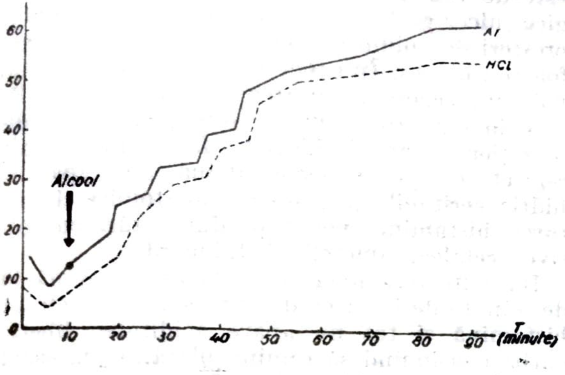


Fig. 56. — Curba acidităţii în ulcerul duodenal (în „scară").

liber şi aciditatea totală. Metoda Leporski introduce cele două noţiuni de *reziduu* şi *efort pe oră*, prin care se apreciază tulburarea în evacuarea gastrică şi hipersecreţia gastrică.

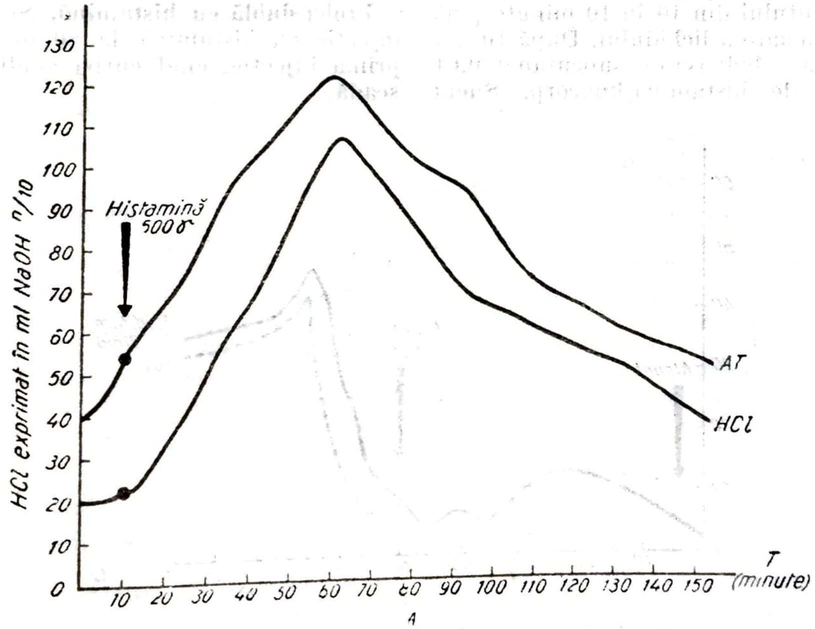


Fig. 57. — Curba secreţiei de acid clorhidric după histamină.

Interpretare

1. Reziduul crescut fără ca efortul pe oră să fie modificat indică deficienţa funcţiei evacuatoare a stomacului.

2. Efortul pe oră crescut, singur, indică o hipersecreţie gastrică.

3. Reziduul crescut paralel cu efortul pe oră indică o deficienţă de evacuare a stomacului şi o hipersecreţie.

Aciditatea totală merge paralel cu cea liberă.

Valorile maxime sînt între 30 şi 70 ml la 40—60 de minute.

Curba creşte şi descreşte uniform.

În caz de hiperaciditate, aciditatea totală merge paralel cu cea liberă.

Aciditatea liberă creşte rapid, atingînd la 30–40 de minute valori de 40–80 ml NaOH N/10 iar aciditatea totală 70—100 ml NaOH N/10.

În ulcerul duodenal, curba acidităţii se prezintă în scări.

Curba prezintă valori mari, atingînd maximum 90—100 ml NaOH N/10 în 3 ore.

Proba cu cafeină constă în introducerea a 0,3 g cafeină pură dizolvată în 300 ml apă distilată, la care se adaugă 3 picături dintr-o soluţie de albastru de metilen 1%.

La administrarea stimulatorului şi la extragerea sucului gastric se procedează la fel ca în cazul probei cu alcool.

Avantajul probelor cu alcool şi cafeină este furnizarea sucului gastric limpede şi lipsit de resturi alimentare.

Proba cu histamină. O probă care dă un suc gastric pur este aceea care utilizează ca mijloc de excitație a secreției *histamina*. Proba este bazată pe proprietatea excito-secretoare a histaminei asupra glandelor gastrice. Se execută mai întîi un tubaj pe nemîncate, cu extragerea conținutului din 10 în 10 minute pînă la completa evacuare a lichidului. După 10 minute se injectează bolnavului subcutanat 0,01 mg clorhidrat de histamină/kilocorp. Sucul gastric secretat se aspiră după injecție timp de 1 oră și jumătate; prima oră, din 10 în 10 minute, iar ultima jumătate de oră, din 15 în 15 minute. Secreția normală începe la 10—20 de minute de la injecție și atinge un maximum la 30—60 de minute. Cantitatea totală secretată este de 100--150 ml. În anumite stări patologice (ulcer gastric și ulcer duodenal) se produc creșteri de volum de 200—300 ml, cu aciditate foarte ridicată. În cancerul gastric, dimpotrivă, volumul scade, aciditatea este aproape nulă.

Valoarea probei cu histamină constă în diferențierea anaclorhidriei false funcționale refractare față de alcool-cafeină, de o anaclorhidrie veritabilă prin leziuni anatomice. Injectarea histaminei poate produce stări congestive, cefalee, amețeli și tahicardie.

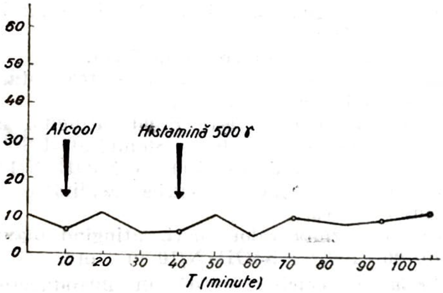


Fig. 58. — Curba acidității gastrice în caz de rezistență la histamină.

Dacă în lipsa unei acidități libere, după 40 de minute de la începutul probei, se injectează histamină și tot nu apare aciditatea liberă, curba continuînd să rămînă plată, avem cazul unei anacidități histaminorefractare.

Dacă după 40 de minute de la începutul probei apare aciditatea liberă și valorile cresc, iar curba ia forma de clopot, aceasta denotă că mucoasa rămasă mai este capabilă să secrete și avem cazul unei anacidități histaminopozitive.

Proba dublă cu histamină. Se face o a doua injecție cu histamină la 80 de minute de la prima injecție, cînd curba acidității începe să scadă.

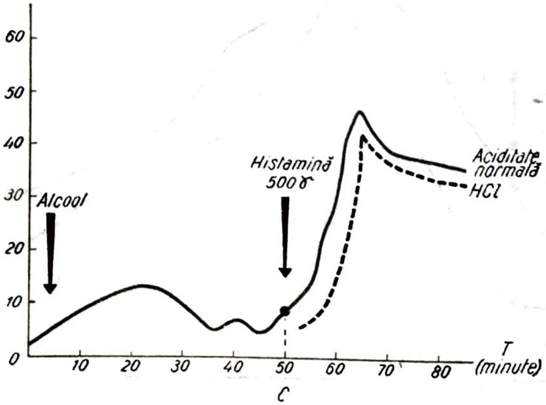


Fig. 59. — Proba cu histamină indică o aciditate normală într-un caz cu aciditate scăzută în proba cu alcool.

La normali se obține un nou pisc, care coboară după 160 de minute. În hipersecreție, curba rămîne ridicată în platou, nefiind influențată de a doua injecție.

Proba cu insulină sau testul Hollander. Se execută mai întîi un tubaj pe nemîncate, cu extragerea totală a conţinutului gastric; se injectează intravenos 6—12 u. insulină şi se recoltează din 15 în 15 minute suc gastric. Se obţine aciditate ceva mai redusă decît după histamină, iar secreţia obţinută are o putere peptică mai mare. Mecanismul secretor este determinat de hipoglicemie; o concentraţie de glucoză în sînge sub 45 mg% declanşează o secreţie acidă bogată. Stimulul secretor se transmite pe cale vagală; la vagotomizaţi sau după ingestie de atropină, răspunsul secretor acid lipseşte. Testul are o valoare deosebită pentru diferenţierea vagotomiei complete de vagotomia incompletă.

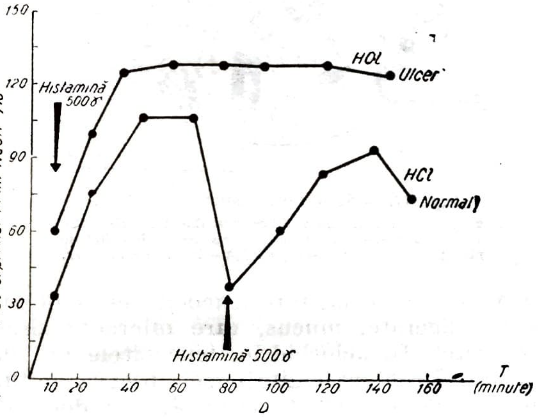


Fig. 60. — Curba acidităţii gastrice în proba dublă cu histamină.

Sondajul postprandial (metoda Lickint). Dimineaţa se face un sondaj obişnuit, apoi se serveşte masa de prînz: la 5 ore după masa de prînz se execută un nou sondaj. Se poate constata, în modul acesta, după o anaciditate matinală, o hipo- sau normo- aciditate după amiază, respectiv după o hipoaciditate matinală o normo- sau hiperaciditate la sondajul de după masa de prînz.

Chiar şi după o anaciditate refractară la histamină, găsită dimineaţa, se poate obţine deseori acid liber în perioada secreţiei optime spre seară (aciditate funcţională).

Tubajul gastric este indicat în toate afecţiunile tubului digestiv, dar este contraindicat în boli pulmonare grave, hipertensiuni, miocardită gravă, asistolie, angină pectorală, anevrisme şi hemoragii recente.

În cazurile contraindicate se recomandă explorarea funcţiei evacuatoare a stomacului cu metode indirecte fără tubaj.

Proba cu salol. O dată cu dejunul de probă se administrează bolnavului 1 g salol. Salolul se descompune în intestin, în fenol şi acid salicilic. Acidul salicilic se resoarbe şi se elimină prin urină, unde poate fi pus în evidenţă prin colorare în violet cu perclorura de fier 2%, în care scop se examinează urina din 10 în 10 minute. În mod normal, eliminarea acidului salicilic începe la 75 de minute după ingerare, o întîrziere indicînd o jenă evacuatoare.

Metoda Sahli sau proba cu desmoid se bazează pe digerarea ţesutului conjunctiv, cînd funcţia digestivă a stomacului este normală. Pentru aceasta se administrează bolnavului, la prînzul de probă, cîteva caşete de cauciuc umplute cu albastru de metilen şi închise cu ajutorul unui fir de catgut. În stomac, dacă digestia decurge normal, catgutul se digeră, caşetele se deschid, iar substanţa colorată se resoarbe, ajungînd în urină. În mod normal, în 5 — 7 ore de la înghiţirea caşetelor, urina se colorează în albastru.

Un rezultat negativ poate fi însă datorit şi tranzitului prea rapid al pilulei sau rezecţiei gastrice.

Metode cu rezine schimbătoare de ioni. Principiul metodei cu rezinele schimbătoare de ioni se bazează pe introducerea în stomac a unei răşini chininice, care cuplează ionul de H^+ al acidului clorhidric. Răşina se elimină în urină unde se poate determina cu ajutorul unei metode fluorometrice.

Metoda poate evalua doar aciditatea liberă, nu şi cea legată. Nu a ajuns să capete o extindere de rutină în laboratorul clinic, fiind utilizate celelalte metode indirecte, la fel de fidele şi mai comode.

Dintre acestea, cea mai mare răspîndire o are determinarea uropepsinei (vezi determinările enzimatice).

Hiperaciditatea, hipoaciditatea sau anaciditatea nu sînt elemente care să determine un diagnostic. Curbele de aciditate menţionate nu sînt strict legate de anumite afecţiuni, aşa încît nu se poate pune diagnosticul unei afecţiuni gastrice numai pe baza curbei de aciditate. Ele oferă totuşi importante indicii, deoarece este sigur că în unele boli predomină anumite tipuri de curbe.

Aciditatea sucului gastric variază în 24 de ore.

Noaptea, aciditatea este redusă; ea creşte peste zi, atingînd un maximum către seară.

EXAMENUL MACROSCOPIC AL SUCULUI GASTRIC

Lichidul de stază (pe nemîncate) şi sucul gastric extras după prînzul de probă se recoltează în vase de sticlă, pentru a fi supuse mai întîi examenului macroscopic (aspect, cantitate, miros, culoare, raport de stratificare) şi apoi examenului chimic, care constă din determinarea pH, a acidității, a substanțelor anormale (sînge, bilă) şi a activității digestive reprezentate de pepsină, renină, catepsină şi lipază.

Cantitatea de suc gastric se măsoară cu cilindrul gradat şi are limite bine definite, în funcție de metoda de recoltare aplicată.

Aspectul. La scurt timp după recoltare, pe conținutul stomacal, după prînzul de probă, se pot distinge două straturi: unul inferior, format din resturi de pîine, şi unul superior, compus din ceaiul ingerat şi sucul gastric secretat. În condiții normale, cele două straturi sînt egale; un volum de lichid crescut indică o hipersecreție gastrică sau o încetinire a evacuării.

Mirosul, în mod normal, este fad sau uşor acid, foarte acid în hiperaciditate, fetid în cancerul gastric şi fecaloid în ocluzia intestinală superioară şi în fistula gastro-colică.

Culoarea sucului gastric este, în mod normal, uşor gălbuie, aproape incoloră; ea este brună-negricioasă în hemoragiile cu stagnare şi roşie sanguinolentă în hemoragiile datorite traumatismelor cu sonda sau fragilitatea exagerată a mucoasei; în sfîrşit, ea este verde-galbenă atunci cînd conține bilă.

EXAMENUL MICROSCOPIC AL SUCULUI GASTRIC

Examenul microscopic se face pe sedimentul obținut prin sedimentarea spontană sau prin centrifugare la 3 000 ture/min. a lichidului recoltat dimineața pe nemîncate sau după prînzul de probă cu alcool sau cafeină. Din acest sediment se pune cîte o picătură pe 4 lame, perfect curate şi numerotate de la 1 la 4.

Preparatul nativ (lama 1): se acoperă cu o lamelă şi se examinează ca atare la microscop.

Preparatul colorat (lama 2): picătura se întinde cu lamela, se usucă şi se colorează la fel ca un frotiu de sînge (May-Grünwald-Giemsa). Lama colorată se examinează cu imersia, pentru punerea în evidență a elementelor celulare şi a microorganismelor, ca: bacili Boas-Oppler, stafilococi, levuri, sarcină etc. În sucurile gastrice anacide se găsesc enterococi, coci, bacili Boas-Oppler. Bacilii Boas-Oppler sînt incriminați în producerea acidului lactic.

În mod normal, în sedimentul sucului gastric se găsesc rare epitelii plate, provenind din mucoasa stomacală, rare leucocite normale sau parțial digerate, mucus, rare microorganisme şi ciuperci. În aclorhidrie, leucocitele nu sînt distruse. În hiperaciditate se observă resturi nucleare, iar în gastrita cronică, abundență de celule plate.

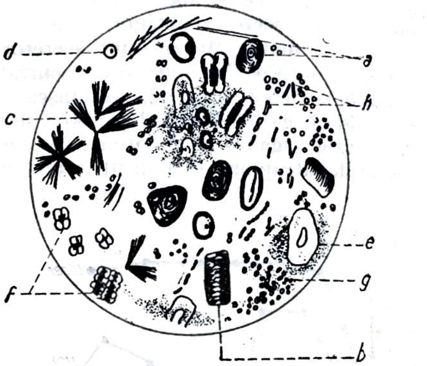


Fig. 61. — Sedimentul sucului gastric.
a—grăunțe de amidon; *b*—fibre musculare: *c*—cristale de acizi grași: *d*—picături de grăsime: *e*—celule epiteliale plate; *f* — sarcine: *g* — ciuperci; *h* — bacili Boas-Oppler.

În cancerul gastric se găsesc uneori celule neoplazice, izolate sau în grup; ele se disting printr-unul sau mai mulți nuclei de volum considerabil.

Preparatul cu Sudan III (lama 3): se amestecă picătura de pe lamă cu o picătură de Sudan III (soluția Sudan III 0,1% în alcool 60° este reactivul specific al grăsimilor), se acoperă cu o lamelă şi se examinează la microscop: grăsimile sînt colorate portocaliu.

Preparatul cu Lugol (lama 4): se amestecă picătura de pe lamă cu o picătură de Lugol (reactivul Lugol: 0,5 g iod + 1 g iodură de potasiu la 100 ml apă), se acoperă cu o lamelă şi se examinează la microscop; granulele de amidon sînt colorate în albastru.

În sucul gastric patologic pot fi întîlnite eritrocite, granule de amidon sub forma unor sfere, grăsimi sub forma unor picături de diferite mărimi sau sub forma de cristale de acizi grași solubili în eter și fibre musculare cu striații transversale. Granulele de amidon nu au valoare diagnostică independentă. Grăsimile găsite în cantitate mare, după un prînz de probă (care nu le conține), indică o încetinire a evacuării. Aceeași indicație o dau și fibrele musculare, care sînt deosebit de vizibile în caz de hiposecreție gastrică. În sucurile gastrice alcaline sau neutre pot fi de asemenea întîlnite diverse cristale de fosfați amoniaco-magnezieni și magnezieni. Cristale de tirozină și de leucină apar în cazuri de stază.

Numărătoarea leucocitelor din sucul gastric. Pentru aceasta se amestecă 1 ml de sediment cu 9 ml ser fiziologic; din diluția obținută se iau 2 ml, la care se adaugă 2—3 picături de albastru de metilen 1%, urmînd operația de numărătoare în camera Burcker, ca la sînge. Numărul leucocitelor este în mod normal de $80-530/mm^3$; el atinge însă $2\,500-6\,500/mm^3$ în gastritele cronice și cancer.

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A SUCULUI GASTRIC

pH sau reacția sucului gastric se poate determina electrometric sau colorimetric. Reacția normală este acidă; sucul gastric înroșește hîrtia de turnesol, pH situîndu-se între 1,6 și 2,0.

Determinarea acidității. Sucul gastric conține acid clorhidric liber, acid clorhidric legat de substanțe proteice (numit acid clorhidric combinat) și acizi organici, ca acidul lactic, butiric, acetic.

Aciditatea se dozează fie pe cantitatea totală a sucului gastric obținut prin tubaj unic, fie în fiecare porțiune a lichidului recoltat în etape după prînzul de probă. Sucul gastric este centrifugat 10 minute la 3 000 ture/min. sau filtrat prin tifon. Supernatantul sau filtratul este apoi supus examenului chimic pentru determinarea acidității libere, combinate și totale.

Dozarea acidității din diferitele categorii amintite se efectuează prin metoda volumetrică cu hidroxid de sodiu N/10 în prezența reactivului Töpfer-Linossier.

Reactivi :

1. Hidroxid de sodiu N/10.
2. Reactivul Töpfer-Linossier: 0,25 g paradimetil-aminoazobenzen + 1 g fenolftaleină în 100 ml alcool 96°. Reactivul are o culoare galbenă-portocalie.

Acidul clorhidric liber colorează reactivul în roșu, pe cînd, în lipsa lui, acidul clorhidric combinat colorează reactivul în portocaliu. Acizii organici din sucul gastric nu schimbă culoarea reactivului Töpfer-Linossier.

Tehnica. Într-un balon Erlenmeyer de 100 ml se pun 10 ml suc gastric filtrat sau centrifugat, 5—6 ml apă distilată și 3—4 picături din reactivul Töpfer-Linossier. Datorită acidului clorhidric liber, lichidul se colorează în roșu. Se adaugă apoi dintr-o biuretă Mohr, picătură cu picătură, soluție de hidroxid de sodiu N/10, pînă cînd culoarea roșie virează spre cea galbenă-portocalie. Se notează cu N_1 numărul de ml de NaOH N/10 utilizați la titrarea acidității libere.

Se continuă titrarea adăugînd din biureta Mohr soluție de NaOH N/10 pînă cînd se neutralizează cantitatea totală de acizi și apare, după o prealabilă colorație a lichidului în galben-deschis, o nuanță de roz. Se notează cu N_2 numărul total de ml din soluția NaOH N/10 utilizați la titrarea acidității totale.

În caz că sucul gastric este colorat se diluează cu apă distilată, pentru a se putea observa culoarea obținută la titrare.

Rezultatele sînt exprimate în ml de NaOH sau în g de acid clorhidric la 1 000 ml suc gastric.

Determinarea acidității libere a sucului gastric trebuie să se efectueze pe lichid proaspăt, deoarece acidul clorhidric liber se volatilizează.

Calcul. Numărul de ml din soluția de NaOH N/10 întrebuințați pentru neutralizarea a 10 ml suc gastric se înmulțește cu 100, pentru a exprima rezultatul în ml NaOH N/10 la ‰ ml suc gastric.

Acid clorhidric liber 1 000 ml suc gastric = $= N_1 \times 100$.

Aciditatea totală la 1 000 ml suc gastric = $= N_2 \times 100$.

Evaluarea cantității în g de acid clorhidric la 1 000 ml suc gastric se face multiplicînd numărul de ml NaOH N/10 întrebuințați pentru neutralizarea a 10 ml suc gastric cu 100 și cu echivalentul în grame al acidului clorhidric, care este 0,00365.

1 ml NaOH N/10 corespunde la 0,00365 g ClH.

Acidul clorhidric liber la 1 000 ml suc gastric $= N_1 \times 0{,}00365 \times 100$.

Aciditatea totală la 1 000 ml suc gastric = $= N_2 \times 0{,}00365 \times 100$.

Prînzurile de probă modifică repartizarea acidului clorhidric liber față de cel combinat prin legăturile care se fac între proteine și o parte din acid.

Valorile normale în cazul extragerii totale (tubaj unic) de suc gastric sînt:

	g ClH ‰	ml NaOH N/10
Acid clorhidric liber	0,50—1	20—40
Aciditate totală	1,90—2	40—60

În cazul probei cu histamină, lipsa intervenţiei substanţelor alimentare face ca fracţiunea de acid clorhidric liber să fie foarte apropiată de cea totală.

Valori normale: Acid clorhidric liber = 1,70 g%. Aciditate totală = 2,00 g%.

Valori crescute: în ulcerul duodenal, în gastrite cronice cu hiperaciditate şi în diferite alte afecţiuni, ca un simptom secundar.

Valori scăzute: în gastritele cronice cu hipoaciditate, în anemia pernicioasă, în neoplasmul stomacului, în diferite infecţii precum şi în intoxicaţii cronice grave. De asemenea, aciditatea gastrică scade, de regulă, cu vîrsta.

Determinarea acidului lactic în sucul gastric

În staza gastrică, în hipoaciditate şi în fermentaţiile substanţelor hidrocarbonate iau naştere acizi organici de tipul acidului lactic, acetic sau butiric. Acidul butiric şi acidul acetic sînt recunoscuţi uşor, după mirosul lor caracteristic.

Pentru identificarea acidului lactic se folosesc următoarele reacţii de culoare:

Reacţia Berg. Reactivul Berg se prepară adăugînd la 100 ml apă distilată, 3 picături dintr-o soluţie de clorură ferică 30% şi 3 picături de acid clorhidric concentrat. Reactivul are o slabă culoare gălbuie.

Tehnica. În 2 eprubete se toarnă cîte 10 ml reactiv. În una din eprubete se adaugă 10—15 picături din sucul gastric de examinat, iar în cealaltă 10—15 picături de ser fiziologic, această eprubetă servind ca martor. Prezenţa acidului lactic intensifică culoarea uşor gălbuie, trecînd într-un galben-verzui, datorită lactatului de fier care se formează (această coloraţie o pot da şi alţi acizi organici, care însă nu se găsesc în sucul gastric). O culoare roşie-portocalie poate fi dată şi de sulfocianatul din saliva înghiţită.

Reacţia Uffelman. Reactivul Uffelman se prepară adăugînd 2 picături din soluţia de clorură ferică 30% la 20 ml soluţie apoasă de fenol 4%. Culoarea albastră-violetă a reactivului se schimbă în galben-verzui, prin adăugare de suc gastric, care conţine acid lactic. Reacţia Uffelman este mai netă, dar mai puţin sensibilă decît reacţia Berg.

Reacţia Deniges. Este o reacţie specifică acidului lactic.

Tehnica. Într-o pîlnie de separare de 50 ml se iau 5 ml suc gastric filtrat şi se adaugă 25 ml eter, se agită şi se lasă în repaus, pentru separarea stratului eteric. Stratul eteric se pune într-o capsulă şi se lasă eterul să se evapore. Reziduul se dizolvă în 0,5 ml apă distilată, se trece într-o eprubetă în care se adaugă 4 ml acid sulfuric concentrat şi se fierbe pe baia de apă 2 minute. După răcire se adaugă 20 ml soluţie alcoolică 5% de răşină de gaiac. În prezenţa acidului lactic apare o coloraţie roşie.

Acidul lactic nu există în mod normal în sucul gastric. El apare în lipsa acidului clorhidric, prin infectarea conţinutului stomacal, în urma unui proces de fermentaţie, care este foarte favorizat de stagnarea alimentelor. Prezenţa acidului lactic indică o hipo- sau anaclorhidrie.

Determinarea sîngelui în sucul gastric (hemoragii oculte)

Sîngele în cantitate mare ia aspectul zaţului de cafea, putîndu-se vedea chiar cu ochiul liber. În cantitate mică se pune în evidenţă prin metodele utilizate la urină şi la materiile fecale: reacţia Weber, reacţia Adler sau reacţia Mayer. Cercetarea sîngelui se face în sucul gastric nefiltrat, neutralizat în prealabil cu o soluţie de bicarbonat de sodiu 1%.

Reacţia Mayer este o reacţie calitativă de evidenţiere a sîngelui.

Reactivi:

1. Alcool acetic: 100 ml alcool 96° + 2 ml acid acetic glacial.
2. Reactivul Mayer: se prepară dizolvînd în 50 ml apă distilată 10 g hidroxid de potasiu, 1 g fenolftaleină şi 5 g zinc pulbere, fierbînd soluţia pînă la decolorare şi filtrînd-o fierbinte.

Tehnica. 2 ml suc gastric filtrat se fierb într-o eprubetă, iar după răcire se adaugă 2 ml alcool acetic, 0,5 ml reactiv Mayer şi 2—3 picături apă oxigenată. În prezenţa sîngelui se produce o coloraţie roşie.

Determinarea pigmenţilor biliari în sucul gastric

Prezenţa bilei dă sucului gastric o culoare verde caracteristică, atunci cînd conţine şi acid clorhidric liber, sau galbenă, în lipsa acestui acid. Pentru recunoaşterea pigmenţilor biliari se folosesc următoarele reacţii de culoare.

Reacţia Gmelin este o reacţie de orientare.

Reactivi :

Acid nitric-nitros. La 10 ml acid azotic se adaugă un mic cristal de nitrit de sodiu.

Tehnica. La 10 ml suc gastric se adaugă în fundul vasului 2—3 ml acid nitric nitros. După cîteva minute, în zona de separare a celor două lichide apar o serie de inele colorate în galben, roşu, albastru, verde.

Reacţia Grimbert este o reacţie mai sensibilă decît precedenta.

Reactivi :

1. 10% sulfat de Na + 10% fosfat disodic (V/V).
2. Clorură de bariu 10%.
3. Bicarbonat de Na 10%.
4. Alcool 5% acidificat (95 ml alcool 96° + 5 ml HCl concentrat).

Tehnica. Se neutralizează 10 ml suc gastric cu bicarbonat de Na, se adaugă 2 picături reactiv (1) + 5 ml soluţie de clorură de bariu. Se agită, se centrifughează, iar precipitatul obţinut, bilirubinatul de Ba, este spălat cu apă şi dizolvat în 5 ml alcool acidificat şi 3 picături de apă oxigenată. Se fierbe pe baia de apă, după care, în prezenţa pigmenţilor biliari, se produce o coloraţie verde în lichidul alcoolic. Reacţia este foarte sensibilă.

EXAMENUL ENZIMATIC AL SUCULUI GASTRIC

1. Determinarea pepsinei

Pepsina are proprietatea de a hidroliza proteinele la pH 1,4—1,7, desfăcîndu-le în aminoacizi.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 10 ml suc gastric filtrat. Se adaugă mici bucăţi de albuş de ou fiert (albuşul de ou este fiert cel mult 5 minute). Într-o altă eprubetă se pun 10 ml suc gastric filtrat, mici bucăţele de albuş de ou şi cîteva picături de HCl N/10. Eprubetele sînt astupate cu un dop de plută şi ţinute la 37°, timp de 3 ore.

Interpretarea rezultatelor. 1. Dacă în prima eprubetă digestia albuminelor de ou s-a terminat în 3 ore înseamnă că activitatea pepsinei şi acidul clorhidric sînt normale.

2. Dacă digestia nu s-a efectuat decît în eprubeta a doua înseamnă că în sucul gastric cantitatea de acid clorhidric este insuficientă.

3. Dacă nu s-a efectuat digestia nici în prima eprubetă, nici în a doua, sucul gastric nu conţine pepsină.

În clinică nu se mai cere determinarea pepsinei deoarece s-a dovedit că prezenţa acidului clorhidric în stomac este paralelă cu prezenţa pepsinei şi deci determinarea acidităţii dă suficiente indicaţii.

2. Determinarea catepsinei

Este bazată pe proprietatea acestei enzime de a hidroliza proteinele la pH 4,5 în proteoze, peptone şi aminoacizi.

Reactivi :

1. Hemoglobină soluţie 2,5% (în tampon fosfat pH 4,5) (vezi hematologie, dozarea hemoglobinei).
2. Acid tricloracetic 25%.
3. Formol neutru : la 100 ml formol 40—50% se adaugă 1 ml fenolftaleină şi apoi hidroxid de sodiu, pînă la culoarea slab roză.
4. Hidroxid de sodiu N/10.

Tehnica. În două eprubete de centrifugă numerotate 1 şi 2, se pun în fiecare cîte 8,5 ml hemoglobină + 1 ml suc gastric.

Eprubeta 1 (proba martor) este tratată imediat cu 0,5 ml acid tricloracetic 25%.

Eprubeta 2 (proba de cercetat) este ţinută la 37°, timp de o oră, şi apoi este tratată cu 0,5 ml acid tricloracetic.

Ambele eprubete sînt centrifugate după tratarea cu acid timp de 20 de minute la 3 000 ture/minut. În două baloane Erlenmeyer, numerotate 1 şi 2, se pun — într-unul din proba martor, în celălalt din proba de cercetat — cîte 5 ml supernatant, se adaugă în fiecare cîte 2—3 picături de fenolftaleină şi apoi soluţie de hidroxid de sodiu N/10, pînă la apariţia coloraţiei slab-roşie.

După neutralizare se adaugă cîte 10 ml soluţie neutră de formol în fiecare balon Erlenmeyer. Coloraţia roşie a probei de cercetat dispare, în timp ce proba martor îşi menţine culoarea. Se adaugă în proba martor 2—3 picături de hidroxid de sodiu N/10, pînă cînd culoarea roşie devine intensă.

Proba 2 se titrează cu soluţie de hidroxid de sodiu N/10, pînă cînd culoarea ei devine identică cu aceea a probei martor.

Calcul : 1 ml NaOH N/10 corespunde la 1,4 mg azot.

mg N la 100 ml suc gastric = numărul de ml din soluţia NaOH N/10 × 1,4 × 200.

3. *Determinarea lipazei*

Proprietatea lipazei de a hidroliza grăsimile în acizi graşi este folosită în determinarea ei în sucul gastric.

Reactivi :

1. Tributirină p. a.
2. Hidroxid de sodiu 1%.
3. Soluţie de turnesol 1%.

Tehnica. Se pun cîte 5 ml suc gastric în 2 eprubete. Conţinutul unei eprubete este inactivat prin fierberea pentru distrugerea fermenţilor, iar după răcire, în fiecare eprubetă se adaugă cîte 1 ml tributirină, cîteva picături de turnesol şi soluţie de hidroxid de sodiu 1%, pînă cînd amestecul devine albastru. Se lasă cele 2 eprubete în termostat la 37°, cîteva ore. În prezenţa lipazei, coloraţia albastră va vira în roşu, fiindcă prin saponificare se pun în libertate acizii graşi.

4. *Determinarea labfermentului*

Labfermentul provoacă în mediu acid sau neutru coagularea cazeinei din lapte; pe această proprietate se bazează determinarea lui în sucul gastric.

Tehnica. 2—3 ml suc gastric filtrat se neutralizează cu NaOH 0,5%, în prezenţa turnesolului. Se amestecă 10 ml lapte nefiert cu 2 ml suc gastric neutralizat şi se lasă la 37°, timp de 10—20 de minute. În prezenţa fermentului laptele coagulează în 10—15 minute. Întîrzierea coagulării denotă o cantitate redusă de ferment. Pentru proba martor se lucrează în aceleaşi condiţii ca mai sus, cu singura deosebire că 2 ml suc gastric neutralizat se fierb 30 minute şi apoi se amestecă cu 10 ml lapte. Martorul nu coagulează.

5. *Determinarea uropepsinei*

Dintre metodele moderne de explorare a funcţiei secretoare gastrice, uropepsina este una dintre cele mai întrebuinţate în clinică, deoarece exprimă aspectul cantitativ al componentei peptice a sucului gastric. Determinarea uropepsinei se face pe o porţiune din urina recoltată timp de 24 de ore.

Metoda Anson-Mirski-Bucher-Gray se bazează pe acţiunea mediului care conţine enzima (suc gastric, sînge, urină) asupra unui strat proteic (hemoglobina), iar aminoacizii rezultaţi sînt determinaţi colorimetric cu reactivul Folin-Ciocîlteu.

Reactivi :

1. ClH 0,3 N.
2. Hemoglobină 2,5 % (soluţia de hemoglobină se acidulează în ziua analizei, prin adăugarea unei soluţii de ClH 0,3 N pînă la pH de 1,5—2).
3. Acid tricloracetic 0,3 N.
4. Hidrat de Na 0,5 N.
5. Reactiv Folin-Ciocîlteu (vezi dozarea fibrinogenului).

Tehnica. 20 ml urină de cercetat se pun într-un balon cotat de 25 ml, se adaugă o soluţie de ClH N pînă la pH 1,5. Volumul urinii acidulate este completat la 25 ml cu apă distilată. Din urina astfel diluată şi acidulată se fac două probe, 1 şi 2.

Proba 1. Într-un tub de centrifugă se pune 1 ml din această urină, plus 5 ml substrat hemoglobină 2,5%.

Amestecul este ţinut la 37°, timp de 30 de minute. Apoi i se adaugă 10 ml acid tricloracetic 0,3 N, pentru a opri reacţia enzimatică. Tubul este agitat puternic, iar suspensia se filtrează sau se centrifughează.

La 5 ml filtrat se adaugă 10 ml NaOH 0,5 N şi 3 ml reactiv Folin-Ciocîlteu (1 ml reactiv se diluează cu 3 ml apă distilată).

Culoarea obţinută după 2—10 minute se citeşte la fotocolorimetru Pulfrich cu filtru verde 570 mμ, cuvă 1 cm.

Proba 2. Într-un tub de centrifugă se pune 1 ml din urina acidulată plus 5 ml substrat hemoglobină 2,5%. Amestecul este tratat imediat cu 10 ml acid tricloracetic 0,3 N şi apoi filtrat. Din filtrat se iau 5 ml care sînt trataţi şi colorimetraţi ca şi filtratul din proba 1.

Extincţiile sînt convertite în mg de tirozină cu ajutorul unei curbe standard.

Diferenţa dintre aceste probe reprezintă activitatea proteolitică a urinii. Unitatea de uropepsină prin această metodă este definită de cantitatea de enzimă care, incubată timp de 30 de minute la 37°, la pH 1,5, eliberează 0,04 mg tirozină. Pentru a transforma miligramele de tirozină în unităţi peptice se aplică formula:

$$\text{U. peptice/24 de ore} = \frac{t \times V}{0{,}04}, \text{ unde:}$$

t = concentraţia în tirozină a urinii cercetate (mg/ml).

V = volumul urinii în 24 de ore în ml.
0,04 = echivalentul în miligrame tirozină al unei unități peptice.

Valori normale : 1 500 — 3 500 u·/24 de ore sau 60 — 250 mg tirozină/24 de ore.

Pentru construirea curbei se prepară soluții cu concentrații crescînde de tirozină dizolvată în ClH 0,3 N (0,015 ; 0,030 ; 0,060 mg tirozină/ml).

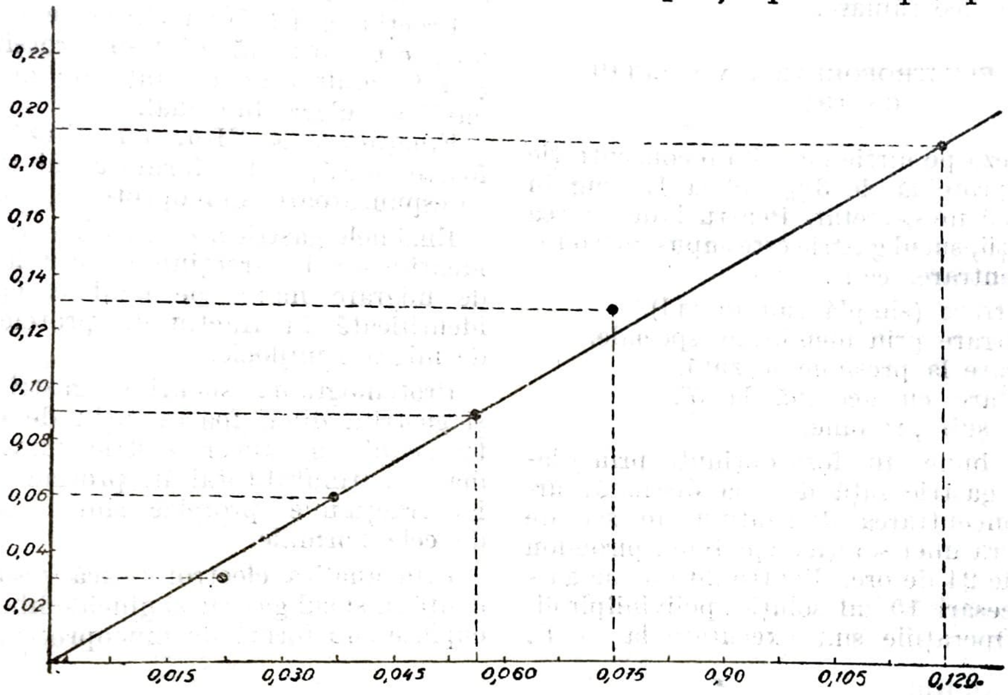


Fig. 62. — Curba etalon de tirozină.

Cu extincțiile citate și concentrațiile cunoscute se construiește curba etalon cu care se poate calcula imediat cantitatea mg de tirozină/ml urină și apoi converti în unități peptice.

Metoda West-Elis-Scott. Metoda este simplă și suficient de precisă.

Principiul se bazează pe acțiunea de precipitare a probei (suc gastric, sînge, urină) asupra unei soluții de cazeină 0,1% la pH 4,9.

Reactivi :

1. Acid clorhidric 2 N.
2. Metiloranj 2%.
3. Tampon acetat pH 4,9 : 40 ml acid acetic m/5 + 60 ml acetat de sodiu m/5.
4. Cazeină 0,1% sau lapte degresat.

Tehnica. Într-o eprubetă se amestecă 2 ml urină de cercetat cu 0,1 ml ClH 2 N și 0,05 ml colorant metiloranj 2%. Amestecul este ținut la termostat la 37°, timp de o oră. Se ia din amestecul incubat 0,1 ml, se adaugă 0,9 ml apă + 1 ml tampon acetat pH 4,9. Se amestecă apoi cu 0,5 ml lapte omogenizat sau cu 0,5 ml soluție de cazeină tratat în prealabil în proporție de 1/1 cu tampon acetat pH 4,9. Amestecul este ținut într-o baie la 37° ; se observă precipitarea cazeinei din lapte. Se cronometrează timpul din momentul adăugării laptelui și pînă la apariția primului precipitat.

Uropepsina se calculează în unități pe oră după formula :

$$\text{u./oră} = \frac{1}{10} \cdot \frac{V}{vt} \cdot \frac{100}{T} \cdot 1{,}32 = 13{,}2\,\frac{V}{T.t.v.}$$

în care :

T = timpul de precipitare a cazeinei din lapte în secunde ;
V = volumul urinii colectate (în ml) ;
t = timpul de colectare (în ore) ;
v = volumul unirii utilizate în reacție (0,1 ml).

Valori normale, 25—50 u./oră.

Interpretare. Valoarea testului s-a impus în diagnosticul diferențial dintre ulcerul și cancerul gastric în hemoragiile digestive superioare, în diagnosticul anemiilor hipocrome, în urmărirea efectelor terapeutice, în boala ulceroasă, boala Addison, în corticoterapie (efecte secundare). Valori joase au fost întîlnite numai la bolnavii cu cancer gastric, anemie pernicioasă, boală Addison, mixedem, gastrectomie totală.

Este o diferență semnificativă între valorile indicate în hemoragiile digestive superioare de origine ulceroasă și valorile scăzute, în cele de origine cirotică. O altă utilizare clinică a uropepsinei constă în studierea secreției gastrice la bolnavi care au fost supuși rezecției subtotale. În general, nivelul uropepsinei postoperatorii reflectă întinderea funcțională a mucoasei gastrice rămase.

ANALIZA ELECTROFORETICĂ A SUCULUI GASTRIC

Electroforeza pe hîrtie necesită o concentrație minimă de proteină de 3%, adică 1,5 mg în 0,05 ml probă de cercetat. Pentru îndeplinirea acestei condiții, sucul gastric este supus metodelor de concentrare, ca:

1. Ultrafiltrare (simplă sau în vid).
2. Ultrafiltrare prin membrane speciale.
3. Evaporare la presiune scăzută.
4. Precipitare cu acetonă la 5°.
5. Dializă sub presiune.

Rezultate bune au fost obținute prin dializa sucului gastric față de apa distilată, urmată de concentrarea dializatului în sac de celofan, contra unei soluții de polivinil-pirolidon 20%, timp de 24 de ore. Pentru 20 ml suc gastric sînt necesari 10 ml soluție polivinilpirolidon 20%. Operațiile sînt executate la + 4°. Prin acest procedeu, sucul gastric este concentrat de 100 de ori. Analiza electroforetică a sucului gastric astfel preparat se execută identic cu analiza electroforetică a serului sanguin în tampon veronal pH = 8,6 forță ionică 0,05, pe hîrtie de filtru Whatman nr. 1 sau hîrtie de filtru ordinară, acoperită cu gel de agar. Prin electroforeză s-au pus în evidență 6 fracțiuni proteice, cu viteze de migrare foarte diferite.

Fracțiunea I (X) migrează cu viteză mică.

Fracțiunea a II-a (M_1) migrează cu viteză mare.

Fracțiunea a III-a (M_2) migrează cu viteză mare.

Fracțiunea a IV-a (M_3) migrează cu viteze intermediare.

Fracțiunea a V-a (M_4) migrează cu viteze intermediare.

Fracțiunea a VI-a migrează foarte repede; deplasarea fracțiunii este foarte mare.

Fracțiunea I (X) cu viteza de migrare foarte mică este formată dintr-o proteină omogenă și este mult crescută față de normal la bolnavii cu ulcer duodenal.

Fracțiunea a VI-a, cu viteză de migrare foarte mică, este formată dintr-o proteină corespunzătoare mucoproteinei Glass-Boyd.

Enzimele gastrice, ca pepsina, renina, au fost identificate în fracțiunile proteice cu viteza de migrare mare, pe cînd catepsina a fost identificată în fracțiunile proteice cu viteza de migrare mijlocie.

Proteinograma sucurilor gastrice din ulcer și gastrită diferă foarte puțin de cea normală. În achilie și cancer gastric survin modificări mari, conținutul total în proteine este crescut, iar fracțiunile proteice sînt complet diferite de cele normale.

Prin analiza electroforetică s-au pus în evidență în sucul gastric și glucide libere, nu numai cuplate sub formă de mucoproteine.

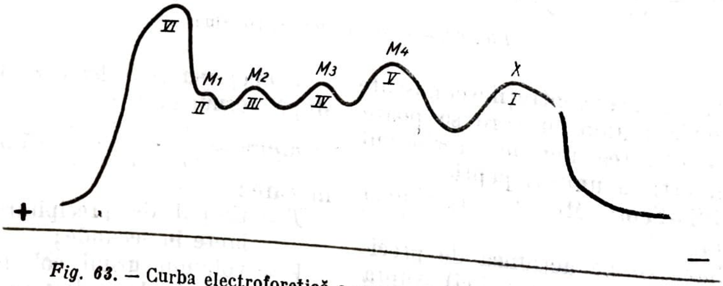


Fig. 63. — Curba electroforetică a sucului gastric (explicații în text).

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A INTESTINULUI

TUBAJUL DUODENAL

Tubajul duodenal se practică cu ajutorul sondei de cauciuc tip Einhorn sau tip Miller-Abott. Cu ajutorul lui se poate cerceta secreția biliară și pancreatică și, de asemenea, se poate efectua explorarea indirectă a căilor biliare.

În sfîrşit, el mai poate avea ca scop cercetarea elementelor proprii duodenale, precum şi a elementelor sale patologice, ca celule, sînge şi paraziţi.

Sucul duodenal este un lichid cu reacţie alcalină care rezultă din secreţia gastrică, din secreţia biliară, din secreţia pancreatică, eliminate toate în duoden şi, în sfîrşit, din secreţia proprie a mucoasei duodenale. Aceasta din urmă elaborează fermenţi ca: *secretina*, care stimulează pe cale hormonală secreţia biliară pancreatică şi intestinală; *enterochinaza*, care transformă tripsinogenul pancreatic în tripsină; *maltaza*, care acţionează asupra glucidelor.

În mod normal, sucul duodenal este un lichid steril, clar, de culoare galbenă-deschisă; în cazuri patologice, lichidul duodenal este tulbure, vîscos, de culoare galbenă-murdară, verzui, roşu-brun sau, în sfîrşit, incolor (în ocluzia căilor biliare). Cantitatea de suc duodenal produsă în 24 de ore este de 1 200 ml; din această cantitate, secreţia biliară reprezintă 700–800 ml, iar secreţia pancreatică 300 ml.

Un studiu izolat al sucului duodenal nu se poate executa cu uşurinţă, deoarece sucul duodenal este un amestec de salivă, suc gastric, bilă, secreţie pancreatică şi secreţie intestinală.

Determinările biochimice la nivelul sucului duodenal au început să intre în practica clinică o dată cu introducerea sondelor diferenţiale cu două sau trei căi. Sucul duodenal poate fi cercetat macroscopic, microscopic şi chimic. Din punct de vedere chimic se poate determina prezenţa hemoragiilor oculte, a bilirubinei, a colesterolului, a acizilor biliari, a proteinelor şi a enzimelor: amilaza, lipaza şi tripsina.

Pentru scopuri diagnostice este suficient să se determine în sucul duodenal numai amilaza, deoarece este primul ferment afectat în insuficienţa pancreatică. Este însă de remarcat că dozarea amilazei în sucul duodenal este lipsită de precizie, datorită faptului că în sucul duodenal există şi ptialină. Determinările de lipază şi tripsină în sucul duodenal sînt cerute numai în cercetările ştiinţifice.

Proba Meltzer-Lyon. Tubajul se face pe nemîncate: la 10–15 minute după ce s-au scurs 20–30 ml suc duodenal (conţinînd „bila A"), se injectează prin sondă 30–40 ml soluţie apoasă 25% sulfat de magneziu.

Proba Meltzer-Lyon se poate înlocui cu o injecţie subcutanată de 2 ml pituitrină, hipofizină sau 1 mg histamină.

După 10–20 de minute de la administrarea soluţiei de sulfat de magneziu sau de pituitrină se scurg pe sondă 10–30 ml de bilă de culoare galbenă-maro închis (bila B, bila veziculară), apoi continuă să se scurgă o bilă de culoare mai deschisă, galbenă aurie (bila C, bila hepatică).

Cele trei bile extrase, bila A, B şi C sînt supuse imediat unui examen macroscopic, microscopic şi chimic. La fiecare porţiune de extract biliar se observă cantitatea şi timpul de scurgere, aspectul şi culoarea. Normal se scurge aproximativ 1 ml bilă/minut. Cantitatea

TABELUL 47

Digestia duodenală

Segment digestiv	Proferment	Activator	Enzimă activă	Substratul digestiei	Rezultatul digestiei
Duoden (suc pancreatic)	Tripsinogen	Enterokinază autocatalitic (urme tripsină)	Tripsină	Proteină nativă Proteoze Peptone	Polipeptide
	Chimotripsinogen	Tripsină, autocatalitic (urme chimotripsină)	Chimotripsină	Proteină nativă Proteoze Peptone	Polipeptide
			Carboxipeptidază	Polipeptide	Peptide inferioare Aminoacizi
	Procarboxipeptidază	Tripsina	Erepsină	Peptone	Aminoacizi Peptide
			Aminopeptidază	Polipeptidază	Aminoacizi
			Nuclează	Acizi nucleici	Nucleotide
			Amilază	Amidon	Maltoză
			Maltază	Maltoză	Glucoză
			Lipază	Grăsimi neutre	Acizi graşi

medie în 24 de ore este de 1 200 ml, dintre care 700—800 ml sînt reprezentaţi de bilă, iar 300 ml, de sucul pancreatic.

EXAMENUL MACROSCOPIC AL BILEI

Bila A şi bila C au o culoare galbenă-aurie, iar bila B are o culoare verde închis sau cafenie. În infecţia căilor biliare, lichidul duodenal prezintă o culoare verzuie. Coloraţia intensă se datoreşte în mare parte bilirubinei, care există în bilă sub formă de bilirubinat de Na.

Variaţiile de culoare observate la cele 3 bile sînt date de cantităţile de bilirubină. Bila B este cea mai închisă la culoare şi conţine o cantitate de bilirubină de 5 ori mai mare decît bila A şi de 10 ori mai mare decît bila C.

Bila A = 12 unităţi van den Bergh.
Bila B = 60 unităţi van den Bergh.
Bila C = 6 unităţi van den Bergh.

EXAMENUL MICROSCOPIC AL BILEI

Este foarte important ca acest examen să se facă imediat după recoltarea bilei, deoarece elementele celulare (şi mai ales lambliile) sînt distruse de către fermenţii digestivi. În mod normal predomină celulele cilindrice sau cilindro-conice (nepigmentate, cu nucleu alungit, unele de provenienţă gastro-duodenală), corpusculii mucinoşi, cilindroizii formaţi din mucină şi cristalele de colesterol sau bilirubinat şi oxalat de calciu. Mai rar se pot afla cîteva polinucleare, enterococi, levuri, sarcine, colibacili.

Ceea ce caracterizează mai ales sedimentul patologic este marea bogăţie în elementele celulare. Sedimentul de tip epitelial conţine un foarte mare număr de celule epiteliale descuamate, pigmentate, provenite din căile biliare. Celulele poligonale şi rotunde, găsite în hepatite şi în angiocolecistite, sînt celule hepatice. Fîşii de epiteliu duodenal, compuse din celule cilindro-conice nepigmentate, se găsesc în duodenite şi în ulcerul duodenal. Celule degenerate multinucleate sau cu nucleu picnotic pot fi celule provenite din canalul pancreatic şi sînt celule prismatice. Sedimentul de tip leucocitar se caracterizează printr-o predominare a polinuclearelor şi indică o inflamaţie a căilor biliare sau un proces supurativ hepatic. În colecistite, leucocitele predomină în bila B, pe cînd în duodenite şi inflamaţii ale căilor pancreatice, ele predomină în bila A. Eozinofilele se întîlnesc în helmintiază. În angiocolite şi în hepatite se mai găsesc în sediment cilindri mucinoşi şi cilindri biliari. Cristalele de acizi graşi găsite pe nemîncate trădează existenţa unei staze gastrice şi prezenţa unei lipaze pancreatice active. Frecventele cristale de colesterol şi de bilirubinat de calciu sînt fără importanţă dacă sînt rare, dar dacă se prezintă dispuse în formaţiuni strînse, ele se interpretează ca microcalculi.

EXAMENUL CHIMIC AL BILEI

În mod normal, pH al celor 3 bile, A, B şi C, este de 6,6—7,6. În infecţiile veziculei biliare reacţia bilei B devine acidă, pH = 4—4,8.

Determinarea colesterolului

Colesterolul se determină ca şi în sînge, prin metoda Grigaut. Eliminarea pigmenţilor biliari în scopul determinării colesterolului se face prin precipitarea bilei cu clorură de bariu. Determinarea nu prezintă interes clinic, deoarece cantitatea variază şi în cazuri normale.

Cantitatea de colesterol din bila A = 20 mg%.

Cantitatea de colesterol din bila B = 200 mg%.

Determinarea acizilor biliari

Acizii biliari se determină prin metoda stalagmometrică. Pipeta cu capacitate de 2 ml se fixează pe un stativ în poziţie perfect verticală şi lichidul biliar se aspiră în stalagmometru, printr-un cauciuc, pînă la nivelul marcat pe pipetă. Se lasă să se scurgă încet, picătură cu picătură, tot lichidul. Numărul picăturilor se notează cu N_1. Pentru proba martor se umple pipeta cu apă, se lasă să se scurgă picăturile şi se numără ca la proba de cercetat; numărul picăturilor se notează N_2 (1 ml apă = 20 picături). În cazuri normale, N_2 este de două ori mai mare decît N_1.

Acizii biliari au o comportare variată faţă de pigmenţii biliari. Astfel, în icterul hemolitic pigmenţii biliari se elimină în cantităţi excesiv de mari, în timp ce sărurile biliare se menţin normale. Acizii biliari scad foarte mult în icterul mecanic şi în ciroze.

Determinarea hemoglobinei

Hemoragiile oculte sînt determinate prin metodele Adler, Weber şi Mayer.

Determinarea pigmenţilor biliari

Bilirubina se determină prin metoda Hijmans van den Bergh. Bila trebuie diluată 1 :10 sau chiar mai mult, în apă, pentru a nu împiedica determinarea colorimetrică. Coloraţia probei are de multe ori o altă nuanţă decît coloraţia probei martor; în aceste cazuri, nuanţa albăstruie se datoreşte unui exces de acizi, iar nuanţa galbenă, unui exces de alcali. În primul caz se compensează aciditatea, alcalinizînd uşor cu amoniac apa cu care se diluează bila, iar în al doilea caz, se adaugă puţin acid clorhidric.

Bilirubina este crescută în icterul hemolitic congenital şi în icterul hemolitic cîştigat, în anemia pernicioasă şi în anemia hemolitică.

Cantitatea bilirubinei este scăzută în icterul mecanic, în hepatita epidemică, în anemiile secundare, cancer şi tuberculoză pulmonară.

În dozarea bilirubinei se ţine seama şi de cantitatea totală de bilă eliminată.

Reacţia Hijmans van den Bergh. Bilirubina dă cu diazoreactivul Ehrlich un compus colorat în roşu. Culoarea se compară cu aceea a unei soluţii etalon de sulfat de cobalt.

Reactivi :

Soluţia A. 1 g acid sulfanilic se dizolvă în puţină apă distilată, la care se adaugă 15 ml acid clorhidric concentrat (D = 1,19). Soluţia se trece în balon cotat de 1 litru şi se completează pînă la semn cu apă distilată.

Soluţia B. Se face o soluţie de 0,5 g% nitrit de sodiu.

În momentul întrebuinţării se amestecă 10 ml soluţie A cu 0,3 ml soluţie B, alcătuind *reactivul diazo.*

Sulfat de cobalt. 2,16 g sulfat de cobalt anhidru sau 3,92 g sulfat de cobalt cu 7 H_2O sînt dizolvate în 100 ml apă distilată, în balon cotat.

Soluţia de sulfat de cobalt 2,16 g% corespunde, din punctul de vedere al coloraţiei, cu o soluţie de bilirubină 1/200 000.

Soluţia 1/200 000 = 1 unitate van den Bergh.

1 unitate van den Bergh = 0,5 mg bilirubină la 100 ml ser.

Tehnica. La 1 ml bilă se adaugă 0,5 ml din reactivul diazo, se agită şi după 5 minute se adaugă 2,5 ml alcool 96°. Se centrifughează şi în supernatant se determină calorimetric cantitatea de bilirubină, comparînd cu soluţia-etalon de sulfat de Co sau cu soluţie de bilirubină de concentraţie cunoscută.

Urobilina se determină cantitativ prin metoda Ehrlich, iar calitativ prin metoda Albert Florence.

Reactivul Albert Florence :

La un amestec de 50 g piridină, 50 g alcool de 95° şi 50 g cloroform se adaugă 7,5 g acetat de zinc pulbere.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 1 ml lichid duodenal şi 0,5 ml reactiv ; se agită uşor, pentru a nu se emulsiona lichidul de cercetat şi apoi se urmăreşte apariţia fluorescenţei, care indică prezenţa urobilinei. În lichidul duodenal normal nu există acest pigment. În bolile infecţioase ale căilor biliare, în ictere hepato-celulare, în ciroza hepatică şi în caz de hemoliză se observă o creştere a urobilinei.

Determinarea albuminei

Albumina se determină prin tratarea lichidului duodenal cu acid acetic glacial şi prin fierbere direct pe flacără; dacă aceasta este prezentă, se produce o opalescenţă sau o precipitare. Bila duodenală normală nu conţine albumină coagulabilă prin fierbere. Reacţia nu are însă o mare valoare diagnostică, întrucît apariţia ei se observă în mod neregulat chiar în bolile grave ale ficatului. Reacţia este uneori intens pozitivă în colecistite.

TABELUL 48

Compoziţia bilei umane normale

	Bila hepatică (bila C)	Bila veziculară (bila B)
Greutatea specifică pH	1,009 – 1,013 1,0 – 8,5 g %	1,26 – 1,30 5,5 – 7,7 g %
Reziduu uscat	1,0 – 3,5	4,0 – 17,0
Substanţe anorganice	0,2 – 0,9	0,5 – 1,1
Baze (total) mEq/l	150 – 180	— —
Cl mEq/l	75 – 110	15 – 30
Ca m Eq/l	4 – 9	10 – 14
Fe mEq/l	0,03 – 7	— —
Mucine	0,1 – 0,9	1,0 – 4,0
Pigmenţi biliari	0,05 – 0,17	0,2 – 1,5
Acizi biliari	0,2 – 2,0	1,5 – 10,0
Lipide totale	0,1 – 0,5	1,8 – 4,7
Colesterol	0,05 – 0,17	0,2 – 0,9
Fosfatide	0,05 – 0,08	2,0 – 0,5

Cercetarea calculilor biliari

Calculii biliari se formează în căile biliare extrahepatice și mai ales în vezicula biliară. La om, calculii biliari sînt compuși, în mod obișnuit, din 75—95% colesterol, restul fiind reprezentat de bilirubinat, fosfat și carbonat de calciu.

Tipuri de calculi biliari : *calculi de colesterol pur, calculi de bilirubină, calculi de carbonat de calciu* și *calculi micști* : *calculi de calciu-colesterol, colesterol - calciu-pigmenți biliari* și *calciu-pigmenți biliari.*

Calculii biliari sînt spălați cu precauție, uscați la 105° și supuși apoi examenului macroscopic și examenului chimic.

Examen de orientare. Se cercetează în primul rînd numărul, forma, culoarea, aspectul, duritatea și structura calculilor, apoi prin arderea unei porțiuni dintr-un calcul pe o lamă de platin sau într-un creuzet de porțelan se poate căpăta o primă orientare asupra recunoașterii lor. Calculii care conțin colesterol, prin încălzire ard și se carbonizează. Cei care conțin pigmenți biliari după ardere devin bruni verzui, iar cei care conțin calciu capătă o culoare albă-albăstruie.

Examenul chimic al calculilor biliari. Examenul constă în identificarea carbonaților, fosfaților, calciului, magneziului, pigmenților biliari și a colesterolului.

Examenul se efectuează pe calculi sfărîmați, aduși în stadiul de pulbere.

Carbonați. Pentru identificarea carbonaților, reacția se face într-o eprubetă prevăzută cu un dop, prin care trece un tub de sticlă curbat și efilat la capătul exterior. În eprubetă se pune o cantitate de circa 0,5—1 g de pulbere și se tratează cu 5 ml acid acetic concentrat. Capătul efilat este introdus într-un vas cu apă de barită. La încălzire ușoară se degaje bioxid de carbon, care cu apa de barită formează un precipitat alb de carbonat de bariu. Precipitatul alb, indică prezența carbonaților.

Pigmenți biliari. Pentru identificarea pigmenților se fierbe o jumătate de oră pulbere cu acid acetic 5%, se răcește, iar la 2 ml soluție se adaugă o picătură de NO_2K 0,5%. Colorația verde-albastră indică prezența pigmenților.

Colesterolul. 2 picături din soluția obținută prin fierberea pulberei cu acid acetic se evaporă pe o lamă. Cristalele formate se reiau în alcool 90°. Se obțin cristale romboedrice de colesterol hidratat. Colesterolul se poate pune în evidență și prin tratarea a 2 picături de soluție cu 1 ml Cl_3CH și cîteva picături de acid sulfuric concentrat. Pe pereții vasului, la agitare, cloroformul se colorează în roșu, acidul sulfuric în verde. Variațiile de culori indică prezența colesterolului.

Fosfați. 1 ml soluție acetică + 2 ml reactiv sulfomolibdenic dă o colorație în galben, care indică prezența fosfaților.

Reactivul sulfomolibdenic. La 100 ml soluție de molibdat de amoniu 10 % se adaugă încet același volum de acid sulfuric concentrat.

Calciu. 1 ml soluție acetică + 1 ml acetat de sodiu 25% + cîteva picături de oxalat de amoniu 5% formează un precipitat alb insolubil în acid acetic. Precipitatul format indică prezența calciului. În supernatant se determină magneziul.

Magneziu. Filtratul obținut de la precipitarea calciului este tratat cu 1 ml amoniac + 5 picături de fosfat de sodiu 25%; prin frecare cu o baghetă se formează cristale caracteristice de fosfat de magneziu, care indică prezența magneziului.

SUCUL INTESTINAL

Tubajul intestinal se execută cu ajutorul sondei Miller-Abbott, a cărei olivă metalică trebuie să depășească pilorul, angajîndu-se în duoden, apoi în jejun, pînă în segmentul de intestin care trebuie cercetat. Sonda poate ajunge pînă la valvula ileo-cecală, putînd-o chiar depăși.

Sucul intestinal este secretat de glandele intestinale numite glandele Brunner și Lieberkuhn. Cantitatea de suc secretată este de aproximativ 2 litri/24 de ore și are rol digestiv important, prin fermenții pe care îi conține. Sucul intestinal conține următorii fermenți: enterokinaza, lipaza, amilaza, maltaza, lactaza, nucleinaza, aminopeptidaza, dipeptidaza, tripeptidaza, iminopeptidaza și erepsina. Acești fermenți acționează asupra substanțelor proteice, asupra grăsimilor și asupra hidraților de carbon. Fermenții secretați de intestin au proprietatea de a stimula sau de a inhiba secreția fermenților gastrici, pancreatici și a bilei.

La nivelul intestinului subțire se face atît descompunerea substanțelor alimentare, cît și resorbția substanțelor rezultate. La trecerea conținutului din intestinul subțire în cel gros aproape nu mai există substanțe care s-ar putea absorbi, exceptînd apa.

Albuminele se absorb sub forma de acizi aminați; glucidele sub forma de monozaharide, iar grăsimile sub forma de acizi grași și de glicerină. Tot în intestinul subțire se absorb vitaminele, apa și sărurile minerale.

TABELUL 49

Digestia în intestinul subțire

Segmentul digestiv	Enzima activă	Substratul digestiei	Rezultatul digestiei
Intestinul subțire (suc intestinal)	Aminopeptidaza	Polipeptide	Peptide inferioare; aminoacizi
	Tripeptidaza	Tripeptide (specifice)	Aminoacizi
	Dipeptidaza	Dipeptide (specifice)	Aminoacizi
	Iminopeptidaza (polidaza)	Dipeptid (specific)	Aminoacizi
	Nucleaza	Acizi nucleici	Nucleotide
	Maltaza	Maltoză	Glucoze
	Lactaza	Lactoză	Glucoza și galactoza

Secreția intestinală este activată pe cale umorală prin secretină.

Sucul intestinal poate fi examinat, atît macroscopic și microscopic, cît și chimic.

Un studiu izolat al secreției intestinului, privind în special fermenții elaborați de el, nu se poate executa în condiții perfecte, deoarece în sucul extras se găsește un amestec de suc intestinal, gastric, pancreatic și biliar.

Investigarea funcției de motilitate a intestinului subțire se efectuează prin proba cu carmin. Pentru aceasta se administrează *per os*, o dată cu prînzul de probă Gaultier, 0,5 g carmin și se notează timpul scurs de la administrare și pînă la eliminarea primului scaun colorat în roz. Normal, timpul este de 24—48 de ore.

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A COLONULUI

Examinarea scaunului este importantă, ea putînd da informații atît asupra *digestiei*, cît și asupra *absorbției* substanțelor alimentare.

Pentru informații absolut exacte asupra digestiei și absorbției intestinale, bolnavul este supus în prealabil unui regim alimentar de probă, care să conțină țesut conjunctiv, țesut muscular, grăsimi, amidon și celuloză, într-un raport bine stabilit. Regimul cel mai des întrebuințat este regimul Schmidt-Strassburger.

Prînzul de probă Schimdt-Strassburger se administrează 3 zile consecutiv, în felul următor:

Dimineața, la ora 8 : 1/2 litru lapte și 50 g pesmeți.

La ora 10: 1/2 l supă de ovăz strecurată, pregătită din 40 g fulgi de ovăz, 10 g unt, 200 g lapte, 3 000 g apă, un ou și puțină sare.

La prînz, ora 12 : 125 g carne tocată, friptă numai superficial, rămînînd crudă la mijloc, 20 g unt, 250 g pireu de cartofi, pregătit cu 100 g lapte, 10 g unt și puțină sare.

La ora 4 : același regim ca dimineața la ora 8.

Seara, la ora 20 : regim ca la ora 10.

Prînzul de probă Gaultier se compune din 500 g lapte, 100 g pîine, 50 g unt, 100 g carne de vacă și 200 g cartofi. Prînzul se administrează 3 zile consecutiv. După 3—4 zile de regim se face examenul coprologic.

Pentru recunoașterea precisă a scaunelor care provin din regimul de probă se administrează *per os* bolnavului, la începutul regimului, 0,5 g carmin sau 1 g cărbune animal. În mod normal, în 24—48 de ore are loc o colorare în roșu sau în negru a fecalelor.

Dintre investigațiile moderne amintim prînzul format din albumine sau grăsimi marcate cu iod radioactiv (I^{131}), după care se urmărește excreția de iod (I^{131}) în fecale și urină.

Recoltarea. Fecalele sînt recoltate într-un vas curat și uscat, fără a se amesteca cu urina.

EXAMENUL MACROSCOPIC

Examenul materiilor fecale trebuie făcut pe probe proaspete sau, dacă aceasta nu este posibil, se vor păstra probele la gheață 24 de ore. Cantitatea medie evacuată zilnic este de 150—200 g. În condiții fiziologice, fecalele au formă cilindrică și culoare brună, din cauza stercobilinei, derivat al bilirubinei. Culoarea materiilor fecale depinde foarte mult și de acțiunea florei bacteriene. Se va cerceta, de asemenea, eventuala prezență macroscopică a elementelor patologice, ca : mucus, puroi, sînge și resturi alimentare nedigerate.

EXAMENUL MICROSCOPIC

Materiile fecale se examinează pe mai multe preparate proaspete între lamă și lamelă.

În practica examenului microscopic se folosesc 3 preparate, care necesită următorii reactivi :

Soluția Lugol pentru colorarea amidonului și a anumitor microorganisme (la 2 g iodură de potasiu dizolvată în 30 ml apă se adaugă 1 g iod).

Soluția Sudan III, pentru colorarea grăsimilor (2 g colorant Sudan III sînt dizolvate în 100 ml alcool 70% sau într-un amestec acid-alcool de 10 ml alcool 96° + 90 ml acid acetic glacial).

Soluția saturată de albastru de Nil, pentru colorarea acizilor grași.

Preparatul nativ. Pe o lamă de sticlă se pune o mică porțiune din materiile fecale proaspete și se acoperă cu o lamelă. Apoi se exercită o ușoară presiune digitală, pînă cînd se obține un strat uniform, cît se poate de subțire.

Lama cu reactivul Lugol se prepară la fel ca preparatul nativ, cu singura deosebire că înainte de a se acoperi cu lamela se adaugă cîteva picături din soluția Lugol pentru colorarea amidonului.

Lama cu reactivul Sudan III se prepară cu preparatul 2, numai că reactivul Lugol este înlocuit cu reactivul Sudan III, specific pentru colorarea grăsimilor.

Lamele astfel pregătite sînt examinate la microscop, pentru cercetarea resturilor alimentare de origine vegetală : amidon, eritrodextrină și celuloză digerabilă, provenită din pîine, făinoase, cartofi, vegetale. Se cercetează de asemenea fibrele musculare, grăsimile și, eventual, prezența țesutului conjunctiv.

Soluția Lugol colorează amidonul nemodificat în albastru, amidonul parțial digerat în violet negricios.

Dextrinele sînt colorate în roșu-roz de către soluția Lugol.

Amidonul nemodificat sau crud se prezintă sub forma de grăunțe rotunde sau ovale, pe cînd amidonul digerat își pierde structura.

O cantitate mică de amidon se găsește și în materiile fecale normale. Cînd apare în cantitate mare, el indică un peristaltism accentuat în intestinul subțire și gros, îndeosebi în segmentul cecal.

Prezența celulozei digerabile denotă un tranzit accelerat prin intestinul gros ; în mod normal, celuloza se digeră complet în colon.

Fibrele musculare se prezintă sub forma unor mici fragmente colorate, mai mult sau mai puțin intens, în raport cu cantitatea de bilă din intestin. În cazuri patologice se întîlnesc numeroase fibre musculare atît de mari, încît se observă chiar cu ochiul liber.

Digestia fibrelor musculare se face sub acțiunea sucului pancreatic. Prezența unei cantități mari de fibre nedigerate indică o insuficiență funcțională a pancreasului. O cantitate mare de fibre musculare mai poate fi constatată în cazul accelerării tranzitului intestinal.

Grăsimile lipsesc în scaunul normal. În insuficiențele de digestie și absorbție și în tulburările de tranzit, ele apar sub formă de grăsimi neutre, acizi grași și săpunuri.

Grăsimile neutre apar sub formă de picături mici, colorate în galben de pigmenții biliari. Grăsimile sînt colorate de reactivul Sudan III în portocaliu sau în roșu, iar cu albastru de Nil, în roz.

Acizii grași apar sub formă de cristale, ace lungi fine sau lamele și sub formă de picături de diferite mărimi.

Reactivul Sudan III nu colorează cristalele de acizi grași, ci le dizolvă.

Acizii grași sînt colorați în albastru închis cu reactivul albastru de Nil, în soluție apoasă saturată. După colorarea acizilor grași cu albastru de Nil, examinarea trebuie făcută imediat, întrucît colorația dispare foarte repede.

Prin încălzire la flacără, grăsimile și acizii se topesc, formînd picături, iar din picăturile de acizi grași, prin răcire se pot forma cristale în formă de ace.

Săpunurile se prezintă, fie sub forma de cristale, fie ca mase neregulate, cu forme variate. Săpunurile nu se colorează cu Sudan III și nu se topesc prin încălzire.

Eliminarea unei cantități mari de grăsimi indică o insuficiență pancreatică și biliară. Sub influența sucului pancreatic și a reacției alcaline a bilei, grăsimile se emulsionează și apoi sînt scindate în glicerină şi acizi graşi. Glicerina este resorbită imediat, pe cînd acizii graşi sînt insolubili şi devin solubili sub acţiunea acizilor biliari.

EXAMENUL CHIMIC

Se fac următoarele determinări: 1) reacţia materiilor fecale; 2) prezenţa componentelor normale, ca: pigmenţi biliari, mucină; 3) existenţa unor elemente patologice, ca substanţe proteice, sînge, acizi graşi şi amoniac.

Reacţia materiilor fecale se determină cu hîrtia de turnesol, care se aplică pe mai multe porţiuni în profunzime. În mod normal, reacţia este neutră.

Determinarea hemoglobinei

În materiile fecale, hemoglobina este uneori atît de modificată şi se găseşte în cantitate atît de mică, încît se poate pune în evidenţă numai prin reacţii chimice. Procedeele chimice sînt foarte sensibile; din această cauză, rezultatul pozitiv nu are nici o valoare, decît în cazul cînd s-au eliminat complet din regimul alimentar toate alimentele care conţin sînge. Regimul durează 3 zile şi este compus din lapte şi *făinoase.*

Reacţia Gregersen este o reacţie calitativă de culoare pentru hemoglobină.

Reactivi:

1. Benzidină cristale.
2. Acid acetic 50%.
3. Peroxid de bariu (BaO_2).

Reactivul Gregersen se prepară prin dizolvarea a 0,025 mg benzidină şi 0,1 g peroxid de bariu în 5 ml acid acetic 50%. Reactivul poate fi conservat 4—5 zile.

Tehnica. Cu o baghetă de sticlă se ia o foarte mică porţiune din mijlocul bolului fecal şi se întinde cu grijă pe o lamă de sticlă curată. Se picură cîteva picături din reactivul Gregersen, preparat proaspăt.

Dacă materiile fecale conţin sînge, lama se colorează în albastru.

Reacţia Adler utilizează reactivul Adler, care este foarte asemănător cu reactivul Gregersen.

Reactivi:

Benzidină cristale.

Acid acetic 50%.

Apă oxigenată 10%.

În 5 ml acid acetic 50 % se dizolvă 0,025 mg benzidină. După dizolvare completă se adaugă 2 ml apă oxigenată 10%. Reactivul se conservă numai 4—5 zile.

Tehnica. O mică porţiune din materiile fecale se triturează cu 10 ml apă. Se filtrează şi se fierbe filtratul, pentru distrugerea oxidazelor leucocitare.

Reactivul Adler se repartizează în 2 eprubete: o eprubetă serveşte ca martor şi *nu* trebuie să dea în 20—30 de minute o coloraţie albastră sau verzuie, iar în cealaltă se adaugă picătură cu picătură *1—2 ml filtrat fiert şi răcit*: în prezenţa sîngelui apare o culoare albastră.

Reacţia Weber este o reacţie sensibilă, dar mai puţin practicată.

Reactivi:

Acid acetic glacial.

Eter.

Apă oxigenată 3%.

Soluţie alcoolică de răşină de gaiac 2%.

Tehnica. O porţiune de circa 2 g, luată din mijlocul bolului fecal, se omogenizează cu 10 ml apă. Amestecului i se adaugă 3 ml acid acetic glacial şi 15 ml eter. Se agită bine, iar extractul eterat se împarte în 2 eprubete; una va servi drept martor, iar în cealaltă se adaugă 1—2 ml apă oxigenată 3%, apoi, picătură cu picătură, o soluţie alcoolică proaspătă de răşină de gaiac 2%.

Prezenţa sîngelui produce o culoare albastru-închisă.

Reacţia cu fenolftaleină se bazează pe reducerea fenolftaleinei de către hidrogenul pus în libertate de zinc.

Reactivi:

Hidrat de potasiu 20%.

Fenolftaleină 1% soluţie alcoolică 60°.

Pulbere de zinc.

Apă oxigenată 10%.

Într-o capsulă de porţelan se cîntăresc 2 g de fenolftaleină, la care se adaugă 100 ml hidroxid de potasiu 20%. Amestecul se încălzeşte la fierbere pînă la dizolvare şi apoi se adaugă treptat pulbere de zinc pînă la decolorare completă. Fenolftaleina roşie în mediu alcalin este redusă în fenolftaleină incoloră, sub influenţa hidrogenului provenit din acţiunea hidroxidului de potasiu asupra zincului. Decolorarea se face în maximum 10 minute, cu aproximativ 10 g pulbere de zinc.

Reactivul se filtrează şi se conservă timp îndelungat cu puţină pulbere de zinc pe fundul vasului.

Tehnica. Se face o suspensie 1/10 a materiilor fecale în apă distilată. Suspensia se fierbe, se răceşte în curent de apă, apoi se adaugă 2 ml din reactivul cu fenolftaleină şi 3 picături de apă oxigenată 10%. Lichidul se colorează în 5 minute în roşu, dacă reacţia este pozitivă.

Reacţia cu ortotoluidină prezintă avantajul păstrării reactivului timp îndelungat.

Reactivi :

Soluţie de ortotoluidină 4% în etanol. Soluţia de ortotoluidină în etanol se păstrează o lună la +4°.

Acid acetic glacial.

Apă oxigenată 20%.

Tehnica : la soluţia de ortotoluidină 10 % se adaugă un volum egal de acid acetic glacial. Un gram de fecale se omogenizează prin fierbere, cu 5 ml apă distilată. Într-o eprubetă se introduc 4 picături din soluţia de ortotoluidină cu acid acetic şi o picătură de apă oxigenată. La această soluţie se adaugă o picătură din suspensia de materii fecale. Culoarea verde-albastră care apare, indică prezenţa sîngelui în materiile fecale.

Determinarea pigmenţilor biliari

Bilirubina, stercobilinogenul şi stercobilina se pun în evidenţă prin reacţia cu sublimat, prin reacţia cu soluţie de zinc şi prin reacţia cu perclorură de fier.

Reacţia cu sublimat. Reactivul Triboulet: 3,5 g sublimat (biclorură de mercur) + 1 ml acid acetic glacial + 100 ml apă distilată caldă. Reactivul este filtrat după 24 de ore.

Tehnica. O mică cantitate (2—4 g) de fecale este omogenizată într-o eprubetă cu 10 ml reactiv, pînă la căpătarea unei consistenţe semilichide. Amestecul se lasă în repaus la temperatura laboratorului. Reacţia se citeşte după o jumătate de oră şi, pentru o siguranţă mai mare, din nou după 24 de ore. La 37°, reacţia este foarte mult accelerată şi se poate citi chiar după o oră.

Culoarea verde a supranatantului, cît şi a sedimentului indică prezenţa pigmenţilor biliari, adică prezenţa bilirubinei. În absenţa pigmenţilor biliari, amestecul îşi păstrează culoarea iniţială.

În prezenţa stercobilinei sau a stercobilinogenului, atît supranatantul, cît şi sedimentul se colorează în roşu-cărămiziu.

Această culoare se obţine şi în cazul cînd materiile fecale conţin leucostercobilina. În felul acesta, prin reacţia cu sublimat se pot diferenţia materiile fecale acolice de acelea care conţin derivatul incolor al pigmenţilor biliari.

Reacţia cu acetat de zinc pune în evidenţă prezenţa pigmenţilor biliari.

Reactivi :

Soluţia saturată de acetat de zinc: 10 g acetat de zinc în 100 ml alcool etilic sau amilic.

Soluţie de iod: 1 g iod în 100 ml alcool.

Tehnica. O cantitate de 2—4 g de fecale sînt omogenizate cu 10 ml soluţie alcoolică saturată de acetat de zinc. Omogenizatului i se adaugă cîteva picături din soluţie alcoolică de iod şi se filtrează. Reacţia se examinează după 24 de ore. Filtratul prezintă o fluorescenţă verde în prezenţa pigmenţilor biliari.

Reacţia cu perclorura de fier. Reactiv Fouchet: soluţie de perclorură de fier ($FeCl_3$) 1:5 în apă. Acid clorhidric concentrat [D = 1,19].

Tehnica. 1 g materii fecale este omogenizat cu 10 ml apă distilată. Se amestecă 5 ml omogenizat cu 5 ml acid clorhidric concentrat şi se încălzeşte 5 minute la 50°. Se răceşte apoi amestecul în curent de apă şi se adaugă 2—3 picături de perclorură de fier diluată 1:5.

În prezenţa bilirubinei apare o coloraţie verde, iar în prezenţa stercobilinei apare o coloraţie roşie.

Această reacţie este foarte sensibilă şi pune în evidenţă cantităţi foarte mici de bilirubină.

Determinarea grăsimilor totale

Dozarea grăsimilor se face în scaunele strînse timp de 3 zile după regimul de probă cu cantitatea de grăsime exact cîntărită.

Metoda rapidă. Într-un balon de 1 litru se amestecă 10 g materii fecale uscate cu 300 ml apă, în care s-au dizolvat 10 g KOH. Se încălzeşte amestecul pe baia de apă pînă devine transparent, se adaugă 100 ml alcool, se acoperă gîtul balonului cu o pîlnie sau un dop şi se continuă fierberea pe baia de apă 20 de minute.

După fierbere se acidifică lichidul din balon cu acid clorhidric, în prezenţa turnesolului, se filtrează şi se spală de două ori hîrtia de filtru cu alcool. Filtratul + alcoolul întrebuinţat la spălare se adună într-o capsulă şi se evaporă pe baia de apă. Reziduul rămas în capsulă se reia cu eter şi se centrifughează.

Lichidul clar se evaporă din nou și se cîntărește reziduul constituit din grăsimi, în stadiul de acizi grași.

Rezultatul obținut prin cîntărire se înmulțește cu 10, pentru exprimarea acizilor grași în g% materii fecale uscate.

Metoda pentru diferențierea grăsimilor (metoda Rousselt). Într-o capsulă se cîntăresc 30—50 g materii fecale, se triturează cu nisip și se usucă la 105—110°, timp de 18—20 de ore. Substanța uscată se pulverizează, se cîntăresc perfect 5 g și se trec într-un cartuș de filtru, care se așază într-un extractor Soxhlet, pentru a extrage materiile grase cu 200 ml eter anhidru la cald. Extragerea cu eter se oprește după 2—3 ore, și anume cînd eterul de sifonare este incolor. Se evaporă extractul eterat pe baia de apă într-o capsulă și se reia în 5 ml eter. Se centrifughează, iar supernatantul se trece într-o capsulă tarată.

Reziduul reprezintă grăsimile (G) + acizi grași (A).

$$R = G + A$$

Săpunurile (S) rămîn în cartuș.

Reziduul este reluat în 25 ml eter. Acizii grași din extractul eteric sînt titrați în prezența fenolftaleinei (1% în soluție alcoolică 60°), cu NaOH N/10.

1 ml NaOH N/10 corespunde la 0,0284 g acid stearic.

Numărul de ml de NaOH N/10 întrebuințați la titrarea acizilor grași se înmulțește cu 0,0284. Pentru a calcula în g acidul stearic la % în materii fecale se procedează astfel:

Numărul de ml de NaOH N/10 întrebuințați la titrarea acizilor grași × 0,0284 × 20.

Diferența $R - A = G$ (grăsimi).

Pentru determinarea săpunurilor rămase de la epuizarea materiilor fecale cu eter se golește conținutul cartușului într-un vas care conține 5 ml soluție alcoolică 5% acid clorhidric. Se evaporă la sicitate, iar praful se trece într-un cartuș, pentru a fi așezat în extractorul Soxhlet și epuizat cu 200 ml eter anhidru la cald. După 2 ore, picăturile care cad din cartuș sînt incolore; se oprește epuizarea. Extractul eteric în prezența fenolftaleinei se titrează cu NaOH N/10. Numărul de ml de NaOH N/10 se înmulțește cu 0,0284 g acid stearic, iar apoi se înmulțește cu 1,0774, pentru a exprima rezultatul în săpun „S".

Grăsimile totale, acizii grași și săpunurile astfel determinate se raportează la prînzul de probă și, după greutatea totală a fecalelor, se calculează procentual. În mod normal, în scaun se găsesc 4—5 g% din grăsimile existente în regim.

Compoziția normală în grăsimi a scaunului:

— grăsimi totale, 17,5% reziduu uscat;
— grăsimi neutre, 7,3% reziduu uscat;
— acizi grași liberi, 5,6% reziduu uscat;
— acizi grași combinați, 4,6% reziduu uscat.

Din determinarea grăsimilor în scaun se pot trage următoarele concluzii interpretative:

1. Dacă se găsesc *grăsimi totale* — peste 25% din reziduul uscat al scaunului — sîntem în prezența steatoreei.
2. Dacă se găsesc *grăsimi neutre* — peste 11—12% din reziduul uscat al scaunului — sîntem în prezența unui deficit în digestia lipidică.
3. Dacă se găsesc *acizi grași liberi + săpunuri* — peste 15—16% din reziduul uscat al scaunului — sîntem în prezența unui deficit în absorbția lipidică.

Determinarea substanțelor proteice

Materiile fecale nu conțin *substanțe proteice* în mod normal. Ele sînt puse în evidență prin reactivul Triboulet (pag. 102).

Reacția Triboulet. Se pune într-un balon o cantitate de 1—2 g materii fecale, se omogenizează cu 50 ml apă distilată și se repartizează în 2 eprubete, cîte 10 ml omogenizat.

În eprubeta 1 se adaugă 2 ml din reactivul Triboulet.

În eprubeta 2 se adaugă 2 ml apă. Se agită ambele eprubete și se lasă în repaus pînă a doua zi.

În eprubeta 1, eprubeta martor, lichidul supernatant rămîne tulbure.

În eprubeta 2, limpezirea supernatantului indică prezența substanțelor proteice. Ele trădează o inflamație sau o iritație gravă a mucoasei intestinului gros.

Reacția pentru amoniac. Acizii aminați în prezența formolului își pierd caracterul bazic, rămînînd cu funcția carboxil care se poate titra cu hidroxid de sodiu.

Reactivi:

Clorură ferică 30%.
Fenolftaleină soluție alcoolică 1%.
Hidroxid de calciu (var stins) în pulbere.
Formol neutralizat diluat 1/2.
Hidroxid de sodiu N/10.

Tehnica. Într-o capsulă de porţelan se cîntăresc 5 g materii fecale şi se triturează cu 50 ml apă, pînă la omogenizare completă. Se adaugă 5 picături soluţie de clorură ferică, se lasă 10 minute în repaus, se adaugă 10 picături fenolftaleină şi, treptat-treptat, hidroxid de calciu, pînă cînd reacţia devine net alcalină. Se filtrează şi din filtrat se iau 25 ml, la care se adaugă 5 ml soluţie formol. Se agită şi apoi se titrează cu hidroxid de sodiu N/10 pînă la reacţie alcalină, adică pînă la culoarea roşie.

Numărul de ml de hidroxid de sodiu întrebuinţat la titrare, multiplicat cu 40, reprezintă :amoniacul + acizi aminaţi corespunzători la 100 g materii fecale.

În mod normal, cantitatea de amoniac din 100 g fecale corespunde la 40 ml hidroxid de sodiu N/10.

Determinarea azotului : 10 g materii fecale uscate sînt omogenizate cu 100 ml apă distilată. Determinarea N total se face prin metoda micro-Kjeldahl ; valorile normale variază între 4 şi 5 g ‰.

EXAMENUL ENZIMATIC

Determinarea procesului enzimatic provenit din pancreas şi intestin este aproape imposibil de efectuat în materiile fecale, deoarece intervin enzimele bacteriene, care îngreunează interpretarea prezenţei sau absenţei fermenţilor pancreatici.

În fecale s-au pus în evidenţă fermenţi ca amilaza, lipaza, tripsina şi erepsina. Dintre aceşti fermenţi pancreatici ajunşi în fecale se determină numai amilaza şi erepsina, deoarece tripsina şi mai ales lipaza sînt foarte rapid distruse în intestinul gros. Bolnavul este supus unui regim lactat cu o zi înainte de recoltarea materiilor fecale.

Cercetarea amilazei

Metoda Wohlgemuth pune în evidenţă activitatea amilazică.

Reactivi :

Soluţie de amidon solubil 1% în soluţie saturată clorură de sodiu.

Soluţie de iod N/10.

Tehnica. 5 g din materiile fecale de analizat sînt tratate cu 50 ml soluţie de carbonat de sodiu 1%. Amestecul obţinut este centrifugat şi supernatantul clar este pus în 7 eprubete, în cantităţi descrescînde de la 1 ml la 0,05 ml. Se completează volumul cu ser fiziologic pînă la 1 ml şi se adaugă în toate eprubetele 5 ml soluţie de amidon.

Eprubeta nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Supernatant	1 ml	0,60	0,40	0,20	0,15	0,10	0,5	–
Ser fiziologic	–	0,40	0,60	0,80	0,85	0,90	0,95	1
Soluţie amidon	5 ml	5	5	5	5	5	5	5

Eprubetele se ţin timp de 24 de ore la termostat la 37—40° şi apoi se adaugă în fiecare eprubetă cîte o picătură din soluţia de iod N/10. Lichidul din eprubete se va colora, după stadiul în care a ajuns digerarea amidonului, succesiv în : albastru-închis, violet, roşu-gălbui sau galben. Culoarea galbenă-roşietică indică prezenţa dextrinei ; în tuburile cu această culoare, hidroliza amidonului este completă. Culoarea albastră-închisă indică prezenţa amidonului şi lipsa totală a enzimei. La un scaun normal, culoarea galbenă-roşcată apare pînă la tubul 2—3.

Determinarea erepsinei

Sub acţiunea erepsinei, polipeptidele sau peptonele sînt hidrolizate în aminoacizi.

Metoda titrimetrică pune în evidenţă aminoacizii prin titrare cu NaOH.

Reactivi :

Soluţie de peptonă Witte 2%.

Soluţie de formol neutru (se amestecă 100 ml formol 30—40% cu 1 ml fenolftaleină şi apoi se adaugă soluţie de NaOHN/10 pînă la culoarea roz slab).

Fenolftaleină 1%.

Hidroxid de sodiu N/10.

Tehnica. Se neutralizează cu hidroxid de sodiu N/10 soluţia de peptonă, soluţia de formol şi soluţia omogenă 10% de materii fecale.

Proba martor P_1. Într-un balon se amestecă 10 ml soluţie de peptonă, 5 ml de formol şi 2 ml din soluţia de materii fecale. Se produce o aciditate nouă, care se dozează cu hidroxid de sodiu N/10.

Proba P_2. Într-un alt balon se amestecă 10 ml soluţie de peptonă cu 2 ml din soluţia de materii fecale şi se lasă în repaus 1 oră, la 37°, după care se adaugă 5 ml soluţie de formol şi se dozează aciditatea apărută cu hidroxid de Na N/10.

Diferenţa dintre P_1 şi P_2 reprezintă activitatea erepsinei.

Metoda diluțiilor evidențiază aminoacizii prin reacția biuretului.

Reactivi :

Soluție de peptonă Witte 0,1%.

Soluția tampon fosfat N/15 pH 7,8.

Soluția de sulfat de cupru 0,1%.

Soluția hidrat de sodiu 40%.

Tehnica. Într-o serie de 10 eprubete se fac diluțiile de la 1/1 la 1/512 ale soluției 10% de materii fecale; se adaugă la fiecare tub 1 ml soluție de peptonă și 1 ml amestec-tampon și se țin o oră la 37°; se face apoi reacția biuretului. În fiecare tub se măsoară 1 ml soluție de hidrat de sodiu 40% și 0,1 ml sulfat de cupru 0,1%. Citirea se face *începînd cu ultimul tub*; primul tub, în această ordine inversată, care dă reacția negativă, conține o unitate ereptică sau cantitatea minimă de ferment capabilă să hidrolizeze, în 60 de minute, la 37°, 10 mg de peptonă Witte.

Calcul. Exemplu : primul tub care dă negativ reacția biuretului este tubul 6. Deci, în tubul 6 există o unitate ereptică. Activitatea ereptică la 1 ml lichid este egală cu 32 u.

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A PANCREASULUI

Pentru stimularea secreției pancreatice se introduce prin sonda Einhorn în duoden (după o prealabilă evacuare a bilei veziculare prin sulfat de magneziu) o substanță excitatoare, ca : lapte fiert cald (circa 60 ml), HCl $10^{0}/_{00}$ (5–10 ml) sau 3–4 ml eter. Mai rar se utilizează eterul, care se injectează prin sonda Einhorn, în timp de 5 minute, iar recoltarea se face după 15–20 de minute.

Cantitatea de lichid obținută după introducerea eterului variază în limite foarte largi și la persoane sănătoase; de aceea se pot trage anumite concluzii numai în cazul unei scăderi pronunțate.

Stimularea secreției se poate provoca și în urma injectării pe cale intravenoasă a acetilcolinei, secretinei și pancreoziminei. În felul acesta se poate obține un suc pancreatic aproape pur, conținînd mici cantități de bilă, suc gastric și suc intestinal.

Explorarea biochimică a pancreasului comportă 3 grupe mari de investigare :

A. Examenul biochimic al scaunului.

B. Determinările biochimice ale enzimelor pancreatice în sînge și urină.

C. Determinările biochimice în sucul duodenal (examenul fracționat al secreției pancreatice, înainte și după stimulare farmacologică).

Determinările biochimice asupra sucului duodenal cîștigă teren în practică, o dată cu introducerea sondelor diferențiale cu două și trei căi, cum este sonda Lagerlof-Bertalheimer. Aceste sonde permit obținerea sucului pancreatic fără vreo impurificare de suc gastric sau de secreție biliară. Sucul pancreatic este un lichid vîscos, incolor, clar, cu pH 8-8,3 și lipsit de miros. În afară de proteoze, peptone, nucleoproteide, substanțe minerale, care se găsesc sub formă de bicarbonați a căror concentrație ajunge 140 mEq/l, sucul pancreatic mai conține o serie de enzime, ca : tripsina, chimotripsina, carboxipeptidaze, polinucleotidaze, amilază și lipază. Sucul pancreatic reprezintă o importantă sursă de fermenți digestivi ai organismului, iar una din funcțiile sale principale este aceea de a aduce pH duodenal în limitele optime de acțiune.

Bicarbonații proteinelor din sucul pancreatic se formează din CO_2 și H_2O sub acțiunea anhidrazei carbonice.

$$CO_2 + H_2O \underset{\uparrow}{\ldots\ldots>} H_2CO_3$$

Carboanhidraza

Secreția externă este sub dependența unui mecanism reglator triplu :

1. Central, prin intermediul inervației vagale și simpatice.

2. Periferic, sub influența unor reflexe neuronice.

3. Hormonal, sub dependența așa-numiților „efectori", care sînt :

a) *secretina*, care acționează asupra pancreasului, determinînd secreția unui suc apos, sărac în enzime și bogat în apă și în bicarbonați ;

b) *pancreozimina*, care acționează asupra pancreasului, determinînd secreția unui suc vîscos, bogat în enzime ;

c) *hepatocrinina*, care acționează asupra ficatului, determinînd secreția unei bile apoase, sărace în săruri ;

d) *enterocrinina*, care acționează asupra intestinului subțire, determinînd secreția unui suc bogat în fermenți.

e) *colecistokinina*, care acționează asupra veziculei biliare, producînd concentrația ei și eliminarea bilei.

Factorii hormonali, în corelație cu mecanismele de reglare nervoase, duc la secreția sucului pancreatic și la crearea condițiilor locale de mediu (bilă, pH, suc intestinal) necesare activității digestive.

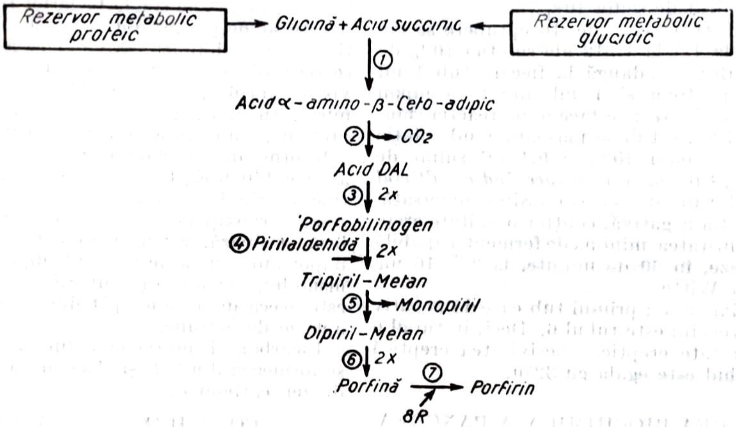


Fig. 64. — Schema formării porfirinelor.

Din punct de vedere fiziologic putem distinge în activitatea pancreasului o funcție *ecbolică* (specializată în secreția enzimelor digestive) și una *hidrokinetică* (specializată în secreția apei și bicarbonaților).

Fermenții pancreatici, ca amilaza, lipaza și tripsina se determină, atît în sucul duodenal sau în sucul pancreatic, cît și în urină și în sînge.

Determinarea amilazei, lipazei, tripsinei, polipeptidazei sînt date la capitolul ,,Enzimele serice ''.

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A FICATULUI

Explorarea biochimică a ficatului, deși îmbracă astăzi numeroase aspecte, prezintă unele limitări datorite particularităților anatomice și fiziologice ale acestui organ.

Funcțiile hepatice sînt multiple și variate. În unele boli, anumite funcții sînt serios atinse, iar altele mai puțin sau chiar de loc.

Ficatul este intim legat cu o serie de organe. Adeseori este dificilă, din acest motiv, izolarea componentei ,,strict hepatice'' dintr-un complex de date fiziopatologice.

Ficatul este organul cu cea mai mare capacitate de *regenerare și compensare.*

El se poate regenera la o ablație de 80% și poate menține funcții normale la o alterare de 15% a parenchimului său.

De aici decurg unele consecințe importante:

a) leziunile discrete pot scăpa unei investigații de laborator, care, în anumite cazuri, nu evidențiază decît fazele ,,avansate'';

b) testele de laborator indică starea de activitate ,,funcțională'' a organului și nu în mod obligatoriu existența unor alterări morfologice.

Apare evident că interpretarea unilaterală a unei explorări în scop diagnostic sau de stabilirea extinderii leziunii poate duce la erori grave.

Tendința actuală este de a evidenția lezarea funcțiilor ,,parțiale'', în corelația lor generală, pentru a putea deduce de aici sensul și gravitatea alterărilor întregului organ.

Testele biochimice hepatice se împart în două categorii:

A. *Teste statice*, care urmăresc dozarea unei componente chimice legată de funcțiile ficatului.

B. *Teste dinamice* sau așa-numitele ,,probe de provocare'', care urmăresc metabolizarea unui compus față de care ficatul prezintă specificitate marcată.

ROLUL FICATULUI ÎN METABOLISMUL Hb ŞI AL DERIVAŢILOR SĂI

Sinteza Hb se face din elemente simple, glicina şi acidul succinic, componente ale rezervorului metabolic proteic, respectiv glucidic. Unirea lor formează acidul α-amino-β-ketoadipic (1), care prin decarboxilare produce acidul δ-aminolevulinic (DAL) (2). Două molecule de DAL dau o moleculă de porfobilinogen (3). O condensare de tip special — „condensarea Corwin" — între 2 molecule de porfobilinogen şi una de pirilaldehidă duce la tripirilmetan (4) care, pierzînd un monopiril, se transformă în dipirilmetan (5), iar acesta printr-o nouă condensare se transformă în nucleul tetrapirolic de bază, „porfina" (6); grefarea a 8 radicali pe nucleii pirolici va forma porfirina (7).

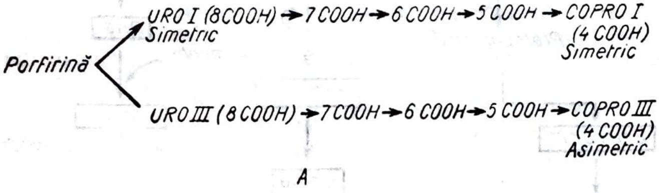

Porfirină
URO I (8COOH) → 7 COOH → 6 COOH → 5 COOH → COPRO I
Simetric
(4 COOH)
Simetric
URO III (8 COOH) → 7 COOH → 6 COOH → 5 COOH → COPRO III
(4 COOH)
Asimetric
A

Fig. 65. — Schema evoluţiei metabolice a porfirinelor.

Evoluţia porfirinei în organism se face de la compuşii cu 8 carboxili pe radicali (8 COOH) de tip „uro" care pot fi simetrici sau de tip I şi asimetrici sau de tipul III, după forma aşezării radicalilor pe nucleii pirolici spre formele zu 4 carboxili de tip „copro" (respectiv simetric I sau asimetric III) şi 2 carboxili de tipul IX, toţi asimetrici.

Coproporfirina de tipul III duce la produşii de tipul IX, trecînd printr-un intermediar în 3 COOH (1) care este precursorul mezoporfirinei IX (2 COOH) (2), hematoporfirinei IX (2 COOH) (3) şi protoporfirinei IX (2 COOH) (4). Aceasta, cuplînd fierul, trece în hem (5), iar prin unire cu o globină specifică în hemoglobină (6) (fig. 65).

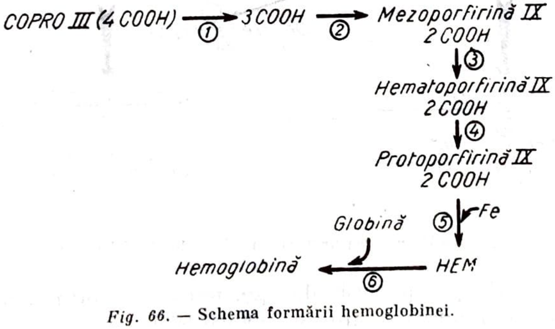

COPRO III (4 COOH)
①
3 COOH
②
Mezoporfirină IX
2 COOH
③
Hematoporfirină IX
2 COOH
④
Protoporfirină IX
2 COOH
Fe
Globină
⑤
Hemoglobină
⑥
HEM

Fig. 66. — Schema formării hemoglobinei.

Biochimia porfirinelor. Uroporfirinele I şi III, de la nivelul sistemului hematopoetic, se transformă în coproporfirine I, respectiv III. Majoritatea coproporfirinei III trece în protoporfirina IX (1), din care în eritrocite se sintetizează Hb. O mică parte a coproporfirinelor ajunge în plasmă, apoi la ficat şi se elimină prin bilă (2), unde i se adaugă porfirinele ingerate şi sintetizate local prin flora microbiană. În felul acesta găsim o eliminare fiziologică de 150—400 γ /24 de ore de coproporfirine în fecale. O cantitate mult mai redusă este eliminată prin rinichi şi se regăseşte în urină (3) sub formă de coproporfirină I şi III (200 γ/24 de ore). Tot prin urină se mai elimină uroporfirine netransformate în coproporfirine (20 γ/24 de ore) şi protoporfirine netransformate în Hb (urme foarte fine).

Patologia porfirinelor. Sinteza Hb poate fi blocată la diferite niveluri. Astfel oprirea reacţiilor la stadiul de tripirilmetan (1) duce la eliminarea urinară de acid DAL şi porfobilinogen, constituind porfiria acută sau hepatică. Devierea sintezei spre produşii de tip I se va manifesta prin prezenţa uro- şi coproporfirinei I în urină, constituind porfiria congenitală sau eritropoetică (2). Blocarea la nivelul Hb (3) provoacă apariţia în urină a protoporfirinei IX, realizînd porfiria cutanată sau tardivă.

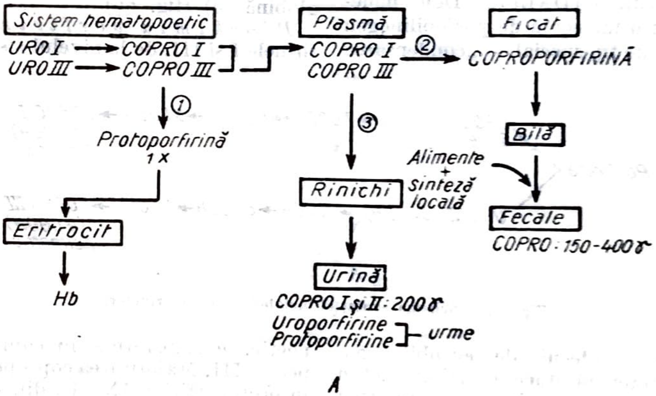

Sistem hematopoetic
URO I → COPRO I
URO III → COPRO III
①
Protoporfirină IX
Eritrocit
Hb
Plasmă
COPRO I
COPRO III
②
③
Ficat
COPROPORFIRINĂ
Bilă
Alimente + sinteză locală
Fecale
COPRO: 150-400 γ
Rinichi
Urină
COPRO I şi II: 200 γ
Uroporfirine
Protoporfirine
urme
A

Fig. 67. — Circuitele porfirinelor în organism.

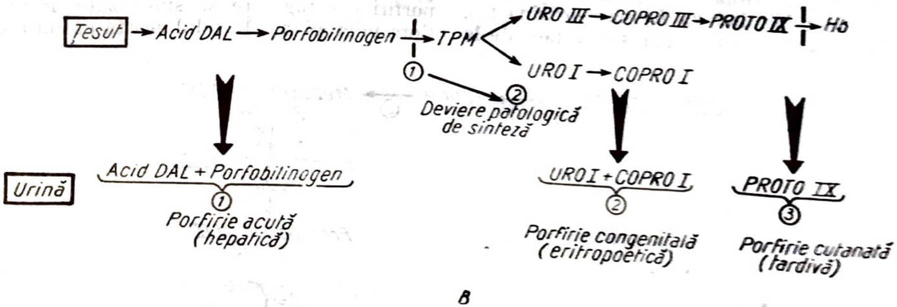

Ţesut
Acid DAL
Porfobilinogen
TPM
URO III → COPRO III → PROTO IX
Hb
URO I → COPRO I
①
②
Deviere patologică de sinteză
Urină
Acid DAL + Porfobilinogen
①
Porfirie acută (hepatică)
URO I + COPRO I
②
Porfirie congenitală (eritropoetică)
PROTO IX
③
Porfirie cutanată (tardivă)
B

Fig. 68. — Eliminarea urinară a porfirinelor în diferite boli.

Datele expuse reprezintă baza teoretică pentru explorarea de laborator a porfirinelor, în diferitele medii biologice (urină şi fecale).

PORFIRINELE URINARE

În urina normală, porfirinele se găsesc în cantităţi foarte mici. În urina din 24 de ore, cantitatea de coproporfirină este de 150—200 μγ, pe cînd uroporfirina nu este dozabilă, există numai urme.

Diferenţa de solubilitate a porfirinelor în solvenţi organici şi fluorescenţa în lumina ultravioletă stau la baza metodelor utilizate pentru identificarea lor. Uroporfirina este insolubilă în eter, pe cînd coproporfirina este solubilă în eter acidulat cu acid acetic.

Determinarea porfobilinogenului

Porfobilinogenul este pus în evidență foarte ușor cu reactivul Ehrlich. Reactivul Ehrlich conține 2 g paradimetilbenzaldehidă în 100 ml acid clorhidric 20% (preparat din 45 ml acid clorhidric D=1,19 plus 55 ml apă). Colorația roșie dată de porfobilinogen cu reactivul Ehrlich persistă după adăugare de cloroform în faza necloroformică, în timp ce pigmenții biliari, ca urobilinogenul, trec în cloroform.

Metoda Schwartz și Watson. Pentru determinarea porfobilinogenului, 5 ml urină proaspătă sînt amestecați cu 2,5 ml reactiv Ehrlich. Se adaugă 2,5 ml cloroform, se agită și se lasă o oră în repaus. Apare o colorație roșie în prezența urobilinogenului și a porfobilinogenului. Prezența porfobilinogenului este pusă în evidență prin colorația roșie a fazei necloroformice. Spectrul de absorbție a acestei faze necloroformice este caracterizat prin două benzi la 553 și 525 mμ.

Determinarea coproporfirinelor și uroporfirinelor

Metoda Brugsch. Prin această metodă se pun în evidență porfirinele solubile în eter și uroporfirinele insolubile în eter.

Tehnica. La 10 ml urină proaspătă se adaugă 2 ml acid acetic glacial și 20 ml eter; se agită puternic pentru ca porfirinele eterosolubile să treacă în eter, iar uroporfirinele să rămînă în soluția apoasă. Se decantează apoi eterul într-o eprubetă lipsită de fluorescență, care se tratează cu 5 ml acid clorhidric 10%, agitînd puternic. Porfirinele solubile în eter, adică coproporfirinele, au trecut în soluția acidă, unde pot fi puse în evidență prin fluorescență roșie sau prin spectroscopie.

Soluția apoasă care conține numai uroporfirine, coproporfirinele au fost solubilizate în eter, este tratată cu un volum egal din amestecul acid acetic glacial + acetat de etil (1 : 3). Uroporfirinele trec în acetatul de etil care se decantează într-o eprubetă lipsită de fluorescență și se tratează cu 5 ml acid clorhidric 10%, agitînd puternic. Uroporfirinele solubile în acetatul de etil trec în soluția acidă, unde pot fi puse în evidență prin fluorescență sau prin spectroscopie.

Lichidele clorhidrice care conțin coproporfirine și uroporfirine au o fluorescență roșie, a cărei intensitate variază în raport cu concentrația coproporfirinei și a uroporfirinei de la carmin deschis la roșu-roz și roșu-cărămiziu.

Dacă extractul este incolor, examinarea se face la lampa cu vapori de mercur, după ce s-a pus în fața lămpii un filtru (sticlă neagră pentru a opri spectrul vizibil, lăsînd să treacă razele ultraviolete care excită fluorescența.

În mod normal, proba Brugsch este negativă. Probele pozitive sînt totdeauna patologice.

Dăm în figura 69 schema de orientare pentru determinarea porfirinelor.

Dozarea coproporfirinelor și a uroporfirinelor

Pentru dozarea coproporfirinelor și a uroporfirinelor sînt necesari următorii *reactivi* :

1. Acid acetic glacial.
2. Soluție saturată de acetat de sodiu.
3. Soluție 3% acetat de sodiu.
4. Acid clorhidric 3N.
5. Acid clorhidric 1,5 N.
6. Eter.
7. Acetat de etil.

Schema de orientare pentru determinarea porfirinelor

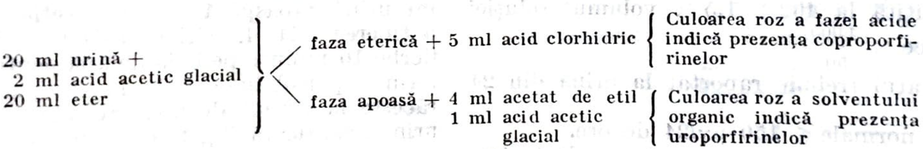

20 ml urină +
2 ml acid acetic glacial
20 ml eter
faza eterică + 5 ml acid clorhidric
Culoarea roz a fazei acide indică prezența coproporfirinelor
faza apoasă + 4 ml acetat de etil
1 ml acid acetic glacial
Culoarea roz a solventului organic indică prezența uroporfirinelor

Fig. 69. — Determinarea porfirinelor.

Metoda de separare a coproporfirinelor de uroporfirine

Într-o pîlnie de decantare se măsoară 50 ml urină, 10 ml soluție saturată de acetat de sodiu, 15 ml acid acetic glacial și 75 ml eter. Se agită fără să se emulsioneze și se lasă amestecul în repaus 1 oră. Se separă prin decantare cele două faze, faza eterică I și faza apoasă II.

Faza eterică I conține coproporfirinele, iar faza apoasă II uroporfirinele. Faza apoasă

II este tratată cu 75 ml eter, agitată şi lăsată în repaus. După separarea celor două faze, faza eterică se uneşte cu prima extracţie eterică. Extracţiile eterice sînt spălate prin agitare de două ori cu 2 ml acetat de sodiu 3%. Această operaţie se face pentru a îndepărta cantităţile antrenate de uroporfirină în faza eterică. Micile cantităţi de acetat de sodiu 3% adăugate pentru spălare se adaugă la faza apoasă II, în care se dozează uroporfirinele.

Dozarea coproporfirinelor

Faza eterică care conţine coproporfirinele este tratată cu cîte 2 ml acid clorhidric 3 N pînă la epuizarea coloraţiei roz a soluţiei eterice. Se aduce soluţia clorhidrică la pH 3,2 cu soluţia saturată de acetat de sodiu şi se trece într-o pîlnie de separare. În pîlnia de separare se măsoară 1 ml acid acetic şi eter de două ori volumul lichidului. Se agită şi se separă faza eterică de cea apoasă. Faza eterică se spală cu 2 ml soluţie 3% acetat de sodiu, pentru a îndepărta urmele de uroporfirină.

Faza eterică, care conţine coproporfirinele, este tratată cu cîte 2 ml acid clorhidric 1,5 N pînă la epuizarea fluorescenţei, notîndu-se volumul soluţiei obţinut ţinînd seama că s-a pornit extracţia din 50 ml urină. Citirile se fac la spectrofotometru.

Densitatea optică se citeşte la 430, 405, 401, 402, 380 mμ. Maximum se observă la 401—402 mμ.

Calcul. μγ coproporfirin ‰ = densitatea optică citită la 402 × 1,5 × volumul soluţiei clorhidrice × $\frac{1\,000}{50}$.

Rezultatul trebuie raportat la urina din 24 de ore.

Valori normale ⩽ 150 μγ/24 de ore.

Citirile se fac la maximum 2 ore de la terminarea reacţiilor.

Dozarea uroporfirinelor

Faza apoasă II, separată la dozarea coproporfirinelor, este tratată cu un volum egal din amestecul următor: acid acetic glacial + acetat de etil (1 :3).

Uroporfirinele trec în acetatul de etil, care este tratat cu cîte 2 ml acid clorhidric 3 N pînă la epuizarea fluorescenţei. Se aduce soluţia clorhidrică la pH 3,2 cu acetat de sodiu şi se trece într-o pîlnie de separare, unde se tratează cu 20 ml acetat de etil-acid acetic. Uroporfirinele extrase în acetatul de etil-acid acetic sînt tratate cu cîte 2 ml acid clorhidric 3 N pînă la epuizarea fluorescenţei notîndu-se volumul final al soluţiei clorhidrice şi ţinîndu-se seama de volumul urinii de la care s-a pornit extracţia.

Se citeşte la spectrofotometru densitatea optică la 430, 405, 401, 402, 380 mμ. Maximum se observă la 405 mμ.

Calcul. μγ uroporfirine ‰ = densitatea optică la 405 × 1,534 × volumul soluţiei clorhidrice × $\frac{1\,000}{50}$.

Rezultatul trebuie raportat la urina din 24 de ore. Valori normale = 2 — 15 μγ/24 de ore. Citirile se fac la maximum 2 ore de la terminarea reacţiilor.

Factorii 1,5 pentru coproporfirine şi 1,534 pentru uroporfirine sînt folosiţi numai pentru cuve de siliciu de 1 cm grosime.

Rezultate pozitive — în afară de leziunile hepatice ca icter, ciroze şi în porfiria congenitală şi acută — se găsesc în afecţiunile tractului digestiv, constipaţie, avitaminoze, intoxicaţii cu plumb, bismut, sulfamide etc.

Identificarea porfirinelor prin electroforeză

Porfirinele sînt concentrate prin adsorbţie pe talc, iar apoi sînt puse în evidenţă prin metoda electroforezei pe hîrtie.

Tehnica. Într-un balon de 100 ml se pun 50 ml urină proaspătă + acid acetic N pînă la obţinerea pH 4. Urina astfel acidificată se fierbe 10 minute pe baia de apă pentru a transforma porfobilinogenul în uroporfirină. Se răceşte la curent de apă. Se adaugă la 50 ml urină acidificată 1 g talc, se agită şi se lasă în contact o noapte. Porfirinele sînt adsorbite pe talc. Amestecul este centrifugat la 3 000 ture/minut, lichidul supernatant clar este îndepărtat, iar sedimentul este tratat cu 10 ml amoniac diluat 1/20. După o jumătate de oră de agitare, eluarea este completă; se centrifughează eluatul, iar supernatantul, care reprezintă cantitatea de porfirine din 50 ml urină, este cercetat electroforetic. Electroforeza se execută pe hîrtie Whatman nr. 1 cu tampon veronal pH 8,6, forţa ionică 0,06. Durata de migrare este între 6 şi 8 ore, cu 0,2 mA/cm. Examinarea petelor de porfirine se face în lumina fluorescentă cu lampa Wood.

PIGMENŢII BILIARI

Circuitele metabolice ale pigmenţilor biliari

Descompunerea Hb la nivelul SRE duce la apariţia unor importanţi derivaţi biochimici, cu semnificaţie patologică marcată. Deschiderea inelului tetrapirolic dă naştere primului compus: verdohemocromul (1). Prin pierderea fierului şi reducere cu 2H, acesta se transformă în biliverdină (2) şi printr-o nouă reducere cu 2H în bilirubină (3). Bilirubina ajunge la nivelul plasmei, sub formă de bilirubinat, de albumină, şi se pune în evidenţă cu reacţia „indirectă" Hymans van den Bergh, de unde şi numele de bilirubină „indirectă" (BRI). Ea trece în ficat (4), unde celula Kupffer o „transformă" printr-un mecanism de „conjugare" şi o elimină prin bilă sub formă de bilirubină „directă" (BRD) (5) sau „conjugată", o mică parte întorcîndu-se sub această formă şi la nivelul plasmei (5 b). Urme extrem de fine pot trece filtrul renal şi se elimină în urină normal în cantităţi nedozabile (5 c). Bilirubina „directă", sub influenţa unui „factor" biliar, se transformă prin reducere cu 4H în mezobilirubină (6) şi printr-o nouă reducere cu 4H în mezobilirubinogen (6 b). Reducerea se poate face şi direct, cu 8H (6 c). Mezobilirubinogenul, numit destul de impropriu şi urobilinogen, ajunge în intestin. Aici el prezintă două căi metabolice principale: sau se reduce cu 4H la stercobilinogen (7) sau se oxidează, pierzînd 2H, la urobilina „IX a" (7 b). Cele 3 substanţe — urobilina „IX a", mezobilirubinogenul şi stercobilinogenul — se resorb în parte la nivelul mucoasei şi formează ceea ce se numeşte corect „urobilinogenul". Acesta ajunge la ficat, realizînd circuitul enterohepatic (8), pentru a se retransforma în bilirubină „directă". O mică parte este eliminată prin plasmă la rinichi şi se găseşte în urină sub formă de urobilină „IX a" şi stercobilină, forma oxidată a stercobilinogenului (8 b). Cantităţile fiziologice ale „urobilinogenului" urinar sînt infime, 0—4 mg/24 de ore şi nedozabile în laboratorul curent.

Bilirubina intestinală, netransformată la nivelul bilei, poate da printr-o reducere cu 12 H direct stercobilinogen (9). Cantităţile nereduse (în proporţie foarte mică) se oxidează şi se elimină sub formă de mezobiliviolină, mezobilifucsină şi pentdiopent (9 b). Stercobilinogenul intestinal neresorbit prin circuitul

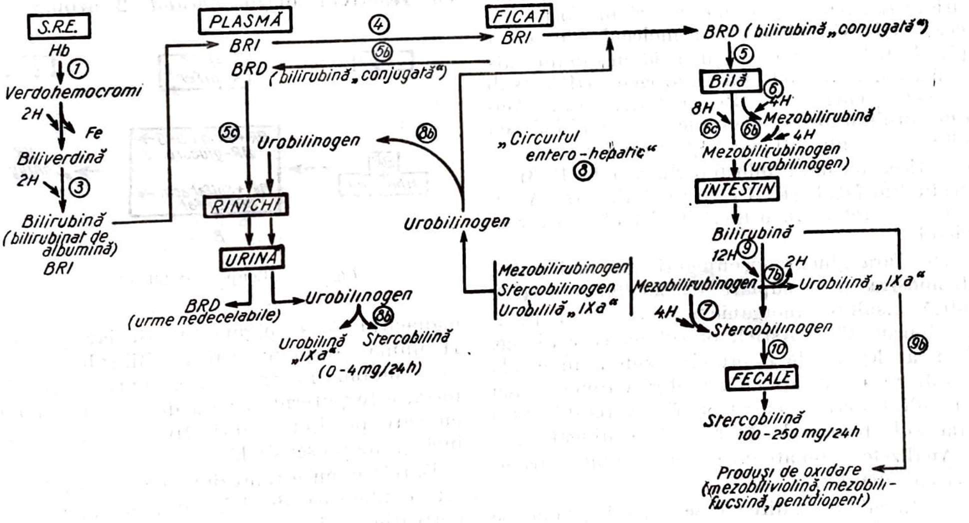

S.R.E.
Hb
①
Verdohemocromi
2H
Fe
Biliverdină
2H
③
Bilirubină
(bilirubinat de albumină)
BRI
PLASMĂ
BRI
BRD
(bilirubină „conjugată")
④
(5b)
FICAT
BRI
BRD (bilirubină „conjugată")
⑤
Bilă
⑥
8H
4H
Mezobilirubină
(6c)
(6b)
4H
Mezobilirubinogen
(urobilinogen)
INTESTIN
(5c)
Urobilinogen
(8b)
„Circuitul entero-hepatic"
⑧
RINICHI
URINA
BRD
(urme nedecelabile)
Urobilinogen
(8b)
Urobilină „IXa"
Stercobilină
(0-4mg/24h)
Urobilinogen
Mezobilirubinogen
Stercobilinogen
Urobilină „IXa"
Mezobilirubinogen
4H
⑦
Bilirubină
12H
⑨
2H
(7b)
Urobilină „IXa"
Stercobilinogen
⑩
FECALE
Stercobilină
100-250 mg/24h
(9b)
Produşi de oxidare
(mezobiliviolină, mezobilifucsină, pentdiopent)

Fig. 70. — Circuitele metabolice ale pigmenţilor biliari (explicaţii în text).

enterohepatic se elimină și el cu fecalele, unde se regăsește sub formă de stercobilină (10) în cantitate de 100-250 mg/24 de ore.

Cercetările moderne au stabilit că bilirubina serului netrecută prin filtrul hepatic — așa-numita „BR-indirectă" — este legată de albumine. Ficatul execută o conjugare, transformînd-o în derivați glucuronici, după următorul mecanism: glucozo-1-fosfatul, provenit din metabolismul glucidic, se unește cu uridintrifosfatul (UTP), sub influența enzimei uridintransferaza și formează uridindifosfatglucoza (UDPG), eliberînd 2 molecule de fosfor (1). UDPG se oxidează în acid uridindifosfatglucuronic, cedînd un hidrogen DPN sub influența enzimei UDPG-dehidraza (2). Acidul uridindifosfatglucuronic se combină cu bilirubina sub influența glucuroniltransferazei hepatice, formînd bilirubinglucuronidul (3) și uridindifosfatul (UDP). Sub influența ATP, acesta se reface în uridintrifosfat (4), care reia ciclul.

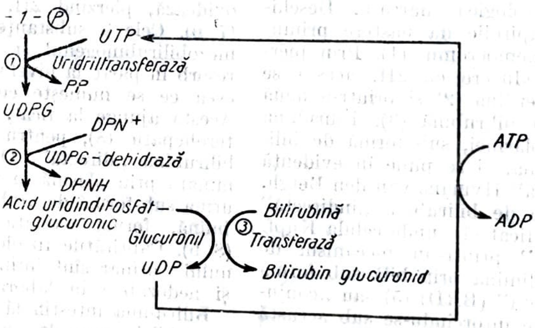

G - 1 - Ⓟ
UTP
①
Uridriltransferază
PP
UDPG
DPN⁺
②
UDPG - dehidrază
DPNH
Acid uridindifosfat-glucuronic
Glucuronil
UDP
Bilirubină
③
Transferază
Bilirubin glucuronid
ATP
ADP

Fig. 71. — Mecanismul glucuronoconjugării bilirubinei.

În afara glucuronoconjugării s-a mai putut demonstra și o cuplare cu „sulfatul activ", adică „sulful anorganic", activat în prealabil prin ATP. Astfel, bilirubina care ajunge la ficat legată de o proteină suferă în celula Kupffer o conjugare cu acidul glucuronic și una cu sulful activ, pentru a fi excretată prin bilă sub formă de bilirubină „conjugată".

Analizele cromatografice au stabilit următoarele detalii:

— Bilirubina indirectă se separă prima pe coloană și formează cu reactivul diazo *întîrziat* un azopigment, numit pigmentul A. Ea este foarte puțin solubilă în apă, se extrage în cloroform, este puternic legată de o serumalbumină, nu precipită cu proteinele decît parțial, este greu oxidabilă și fotosensibilă.

— Bilirubina directă este formată din amestecul a 2 pigmenți I și II, care se separă în ordine pe coloană. Pigmentul I reprezintă esterul monoglucuronic al bilirubinei, iar pigmentul II esterul diglucuronic. Pigmentul I formează cu reactivul diazo *imediat* 2 azopigmenți: pigmentul A și pigmentul B, iar pigmentul II numai azopigmentul B. Bilirubina directă este solubilă în apă, nu se extrage în cloroform, este puternic legată de o serumalbumină cu care precipită cantitativ, este ușor oxidabilă și nefotosensibilă.

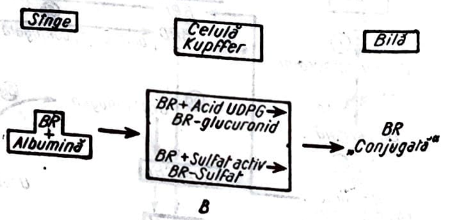

Sînge
Celulă Kupffer
Bilă
BR + Albumină
BR + Acid UDPG → BR-glucuronid
BR + Sulfat activ → BR-Sulfat
BR „Conjugată"
B

Fig. 72. — Conjugarea bilirubinei.

Datele expuse reprezintă baza teoretică pentru explorarea de laborator a bilirubinei și derivaților săi, în diferite medii biologice (urină, sînge, bilă, fecale).

Determinarea bilirubinei în urină

1. **Metoda de orientare** se face cu acid azotic fumans. Se udă cu urină o hîrtie de filtru şi se pune în mijlocul acesteia o picătură de acid azotic fumans: inelele colorate verzui indică prezenţa bilirubinei şi biliverdinei.

2. **Metoda cu iod.** Urina care conţine bilirubină se colorează în verde în prezenţa iodului.

Reactiv: Soluţie alcoolică de iod 1%.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 10 — 15 ml urină şi cu o pipetă efilată se lasă să curgă la fundul eprubetei 2 ml soluţie alcoolică de iod 1%.

Apariţia unui inel verde la zona de contact între urină şi soluţia alcoolică de iod denotă prezenţa bilirubinei.

Reacţia nu este specifică, acest inel apare şi după administrare de antipirină sau piramidon.

3. **Metoda Gmelin.** Constă în oxidarea bilirubinei cu acid azotic în biliverdină.

Reactiv: Acid azotic concentrat (D = 1,19) 100 ml + 0,06 g nitrit de sodiu.

Tehnica. Într-un pahar cu picior se pun 50-100 ml urină. Cu ajutorul unei pipete efilate se introduc, lăsînd să curgă liniştit la fundul paharului, 3-4 ml din reactivul acid azotic + nitrit de sodiu. Reactivul determină în cazul pozitiv apariţia unei serii de inele colorate în verde, albastru, violet, galben. Inelul verde este datorit bilirubinei.

4. **Metoda Franke.** Urina care conţine bilirubină se colorează în verde intens în prezenţa albastrului de metilen.

Reactiv: Soluţie de albastru de metilen 2‰.

Tehnica. La 5 ml urină se adaugă picătură cu picătură albastru de metilen 2‰, pînă ce urina se colorează în verde intens. 2 picături din soluţia 2‰ albastru de metilen corespund la 0,1 mg bilirubină. Proba poate servi la o dozare aproximativă a bilirubinei; dacă urina nu conţine pigmenţi biliari sînt suficiente cel mult două picături de reactiv pentru a colora urina în albastru; în cazul cînd conţine pigmenţi biliari sînt necesare mai multe picături de reactiv, pentru ca tenta verzuie a urinii să dispară şi să apară coloraţia albastră, care indică sfîrşitul reacţiei.

Pentru metoda cantitativă în 10 eprubete se adaugă în ordine descrescîndă urină, de la 10 ml, 9, 8, pînă la 1 ml. Se aduce la volum total de 10 ml cu apă distilată, apoi după completarea diluţiilor se adaugă 2 picături de albastru de metilen în fiecare eprubetă şi se notează care este ultima diluţie în care nu s-a obţinut schimbarea culorii. Cu această metodă, care nu este specifică, se poate totuşi urmări în timp evoluţia bolii. Testul devine negativ înainte ca bilirubina serului să revină în limitele normale.

În cazul urinilor concentrate şi de culoare închisă nu se poate folosi proba cu albastru de metilen.

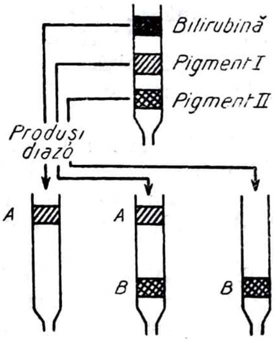


Fig. 73. — Separarea pigmenţilor biliari pe coloana cromatografică (explicaţii în text).

5. **Metoda Ionescu-Matiu** constă în precipitarea bilirubinei cu clorură de bariu sub formă de bilirubinat de bariu care este apoi oxidat în biliverdinat de bariu de culoare verde.

Reactivi: 1) Soluţie de clorură de bariu 10%.
2) Soluţie de bicromat de potasiu 4%.
3) Soluţie de acid sulfuric 20%.

Tehnica. Într-o eprubetă se adaugă 5 ml urină plus 10 ml soluţie clorură de bariu. Se agită şi precipită bilirubinatul de bariu, care se filtrează şi se spală cu apă distilată. Se adaugă direct pe hîrtia de filtru folosită, din loc în loc, cîte o picătură de reactiv preparat în momentul întrebuinţării din 40 ml soluţie de bicromat de potasiu + 10 ml soluţie de acid sulfuric. În prezenţa pigmenţilor biliari se formează în punctele de atingere o serie de zone concentrice, colorate în verde.

6. **Metoda Harrison.** Se precipită bilirubina sub formă de bilirubinat de bariu care prin oxidare cu acid tricloracetic şi perclorură de fier dă biliverdinatul de bariu de culoare verde.

Reactivi: 1) Clorură de bariu 10%.
2) Reactivul Fouchet: 25 g acid tricloracetic + 10 ml soluție de perclorură de fier 10% + 90 ml apă.

Tehnica. 5 ml soluție de clorură de bariu se amestecă cu 10 ml urină și apoi se filtrează prin hîrtie de filtru: se întinde hîrtia de filtru și în mijlocul porțiunii cu filtrat se lasă să cadă 2 picături din reactivul Fouchet.

În caz că există bilirubină apare o colorație albastră verde în jurul picăturilor căzute. Sensibilitatea metodei este de 0,15 — 0,20% bilirubină în urină.

7. **Metoda Grimbert.** Pigmenții biliari dau la oxidare cu acid clorhidric o colorație verde-albastră sau verde-închisă.

Reactivi: 1) Clorură de bariu 10 g% în apă distilată.
2) Alcool-acid clorhidric: 95 ml alcool 96° + 5 ml acid clorhidric concentrat.

Tehnica. Se pun într-o eprubetă 10 ml urină plus 5 ml Cl_2Ba 10%. Se agită și se centrifughează.

Precipitatul se spală de două ori cu apă distilată prin centrifugare și se dizolvă apoi parțial în 5 ml alcool-clorhidric. Amestecul se fierbe un minut pe baie de apă și apoi se centrifughează. În prezența pigmenților biliari, alcoolul va da o colorație verde-albăstruie sau verde închisă.

Alcoolul capătă uneori o colorație negricioasă ceea ce se datorește insuficienței reactivului de a oxida în întregime bilirubinatul de bariu. Numai în acest caz se vor adăuga 2 picături de apă oxigenată 10% și se va fierbe din nou 1 minut pe baie de apă.

În acest caz, colorația verde apare foarte net. Cînd oxidația este mai puțin accentuată poate apărea o tentă roz sau violacee. Dacă pigmenții biliari sînt în cantitate prea mică se va lucra pe o cantitate mai mare de urină (100 și chiar 200 ml).

Determinarea urobilinei și urobilinogenului în urină

Cercetarea urobilinogenului se face în urina proaspătă, iar a urobilinei în urina care are o vechime de cîteva ore. Practic se dozează ambele substanțe la un loc, fie ca urobilinogen fie ca produși de oxidare (urobilină „IX a'' și stercobilină).

Metoda cu acetat de Zn. Reacția se bazează pe fluorescența pe care o dă urobilina cu acetatul de zinc.

Reactivi: 1. Acetat de zinc 10 g fin pulverizat se dizolvă parțial în 100 ml alcool 96°. Reactivul se agită înainte de întrebuințare.
2. Soluție Lugol: 1 g iod + 2 g iodură de potasiu dizolvate în 100 ml apă.

Tehnica. Într-un pahar cu picior se pun 20 ml urină, 20 ml acetat de zinc 20% și 4-5 picături soluție iod 1%; se agită cîteva minute, se lasă în repaus 24 de ore și apoi se filtrează. Se apreciază efectul prin reflexie pe un fond negru; fluorescența verde indică prezența urobilinei.

Pigmenții biliari împiedică punerea în evidență a urobilinei; îndepărtarea lor se face prin tratarea a 20 ml urină cu 2 ml clorură de calciu 10% + 2 ml amoniac concentrat. Se agită și se filtrează, filtratul se acidifică cu acid acetic și se determină apoi urobilina prin fluorescență. Dacă fluorescența nu apare din cauza excesului de aciditate a soluției se adaugă cîteva picături de amoniac și se filtrează.

Metoda Ehrlich. Reacția este bazată pe culoarea roșie pe care o dă urobilinogenul cu paradimetilaminobenzaldehidă (reactivul Ehrlich) în mediu acid.

Reactiv: Reactiv Ehrlich: 5 g paradimetilaminobenzaldehidă sînt dizolvate în 150 ml acid clorhidric concentrat (D=1,19) + 150 ml apă distilată.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 10 ml urină proaspătă și 1 ml reactiv Ehrlich, se amestecă și se observă rezultatul după 3-5 minute. Prezența urobilinogenului este indicată de apariția unei colorații roșii.

Diferențe calitative. Reacția intens pozitivă = culoarea apare imediat la rece.

Reacția pozitivă = culoarea apare după 10 minute la rece.

Reacția negativă = culoarea nu apare nici la rece, nici la cald.

Reactivul Ehrlich dă colorație roșie și cu o serie de alte produse biologice, ca unele proteine, indican, indol, scatol, precum și cu unele medicamente, ceea ce scade valoarea acestei reacții. Reactivul Ehrlich dă o culoare slabă roșie și cu urina normală, dar concentrată. Pentru înlăturarea acestei surse de false interpretări se recurge la diluarea urinii proaspete în proporţiile 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 cu apă distilată la volum final de cîte 10 ml. În fiecare eprubetă se adaugă 1 ml reactiv Ehrlich. Se agită eprubetele, iar reacţia se examinează după 5 minute.

Culoarea roşie apărută în diluţie peste 1/20 = reacţie pozitivă.

Culoarea roşie în diluţie pînă la 1/20 = = reacţie negativă.

Eliminarea urobilinogenului prezintă mari oscilaţii în cursul zilei, ceea ce duce la erori foarte mari. Aceste erori pot fi evitate prin examene de urină repetate în cursul zilei şi al nopţii.

Determinarea urobilinogenului în urină se face timp de cîteva zile. Rezultatele sînt cu atît mai exacte cu cît numărul zilelor de probă este mai mare; în general sînt suficiente 3 zile.

Procedeul de recoltare a probelor. În timpul zilelor de probă se administrează bolnavului alimente fără proteine şi clorofilă. Cantitatea de lichide ingerate se stabileşte la 1 500-2 000 ml/zi. Urina se recoltează între orele 6 şi 18, din 2 în 2 ore, iar urina de noapte constituie o singură probă.

Tehnica. La 2 ml urină proaspătă se adaugă 5 picături reactiv Ehrlich. Examinarea se face după 3-5 minute.

Aprecierea rezultatelor se face în felul următor :

— reacţia negativă (—) = culoarea urinii este neschimbată;

— reacţia slab pozitivă (±) = culoarea urinii indică o uşoară înroşire;

— reacţia pozitivă (+) = culoarea urinii apare după 10 minute şi este roşie ca cireaşa;

— reacţia intens pozitivă (++) = coloraţia roşie intensă apare imediat şi persistă timp îndelungat.

Determinarea pentdiopentului

Pentdiopentul este un compus patologic de oxidare a hemoglobinei. Pentdiopentul sau forma sa neredusă propendiopentul iau naştere ca produse de dezintegrare din verdoglobină, biliverdină, bilirubină, urobilină, şi urobilinogen.

Reactivi : 1. Hidroxid de potasiu 10%.
2. Hiposulfit de sodiu pulbere.

Tehnica. La 10 ml urină se adaugă 2 ml hidroxid de potasiu; amestecul se fierbe şi se filtrează. Filtratului i se adaugă 0,25 g hiposulfit de sodiu şi apoi se fierbe din nou pînă dă în clocot. Existenţa în urină a pentdiopentului este indicată de o coloraţie roşie, iar la spectroscop prezintă o bandă de absorbţie net delimitată în zona verde 525 mμ.

Diferenţierea spectroscopică a pentdiopentului după originea de provenienţă :

— banda la 525 mμ din hemoglobină, hemină, hematină;

— banda la 529 mμ din bilirubină;

— banda la 522 mμ din urobilinogen, urobilină;

— banda la 518 mμ din mezobilirubină.

Dozarea bilirubinei în sînge

Bilirubina este cel mai important produs de degradare a hemoglobinei. Cantitatea normală de bilirubină în ser este în relaţie cu cantitatea de hemoglobină normală. Dintre organele implicate în procesul de eliminare a hemoglobinei, rolul cel mai important îl are ficatul.

Metoda Fouchet. Oxidarea bilirubinei cu clorură ferică duce la obţinerea biliverdinei de culoare verde.

Reactiv : 25 g acid tricloracetic sînt dizolvate în 100 ml apă distilată, la care se adaugă 10 ml clorură ferică 10%.

Tehnica. Se amestecă într-o eprubetă mică sau într-o capsulă de porţelan 6 picături reactiv Fouchet + 6 picături ser. Biliverdina colorează precipitatul albuminos în verde murdar mai mult sau mai puţin închis după cantitatea de pigmenţi. Dacă bilirubina nu depăşeşte valoarea normală, precipitatul albuminos nu se colorează.

Metoda Grimbert. Bilirubina prin oxidare cu perhidrol trece în biliverdină de culoare verde.

Reactiv : La 100 ml alcool 96° se adaugă 5 ml acid clorhidric concentrat.

Tehnica. La 2 ml ser se adaugă 4 ml acid clorhidric şi se menţine amestecul 1 minut pe baie de apă în clocot; se adaugă apoi o picătură de apă oxigenată şi se încălzeşte din nou; în prezenţa unui exces de pigmenţi biliari apare o coloraţie verde, albastră sau violacee.

Metoda van den Bergh. Bilirubina dă cu diazoreactivul un produs colorat în roşu purpuriu, a cărei intensitate este proporţională cu concentraţia bilirubinei prezente.

Reactivi : 1. Diazo I : 0,5 g acid sulfanilic sînt dizolvate în 100 ml apă distilată ; după dizolvare se adaugă 1,5 ml acid clorhidric concentrat (D = 1,19).

2. Diazo II : nitrit de sodiu 0,5 g%.

3. Clorură de sodiu 0,9 g%.

Diazoreactivul Ehrlich se prepară în momentul întrebuinţării amestecînd 10 ml soluţie diazo I (acid sulfanilic 0,5%) cu 0,25 ml soluţie diazo II (nitrit de sodiu 0,5%).

Tehnica. Se iau 3 eprubete de hemoliză în care se pun succesiv :

	Nr. 1 bilirubina directă (ml)	Nr. 2 proba martor (ml)	Nr. 3 bilirubina indirectă (ml)
Ser nehemolizat	0,5	0,5	0,5
Reactiv Ehrlich	0,5	—	0,5
Clorură de sodiu 0,9%	1,0	1,5	—
Alcool	—	—	1

Eprubetele se agită şi se lasă în repaus 5 minute, apoi se face calitativ aprecierea rezultatelor.

Dacă a apărut culoarea roşie în eprubeta nr. 1 = bilirubină directă.

Dacă a apărut culoarea roşie în eprubeta nr. 3 = bilirubină indirectă.

Dacă culoarea roşie a apărut atît în eprubeta nr. 1, cît şi în eprubeta nr. 3 = bilirubină directă şi indirectă.

Determinarea cantitativă se face colorimetric faţă de soluţia de bilirubină care conţine 0,5 mg bilirubină % ml.

O unitate van den Bergh = 0,50 mg bilirubină/100 ml ser.

Metoda Jendrassik. Bilirubina cu acidul sulfanilic diazotat în prezenţa cafeinei dă un compus colorat în roşu-purpuriu.

Reactivi : 1. Soluţie de cafeină : 20 g cafeină + 30 g benzoat de sodiu + 50 g acetat de sodiu cristalizat sînt dizolvate în 400 ml apă distilată la uşoară încălzire.

2. Reactivul diazo I : 2,5 g acid sulfanilic sînt dizolvate în 900 ml apă distilată, după care se adaugă 15 ml acid clorhidric concentrat şi se completează la 1 000 ml cu apă distilată.

3. Diazo II : nitrit de sodiu 0,5%.

4. Clorură de sodiu 0,9%.

Reactivul Ehrlich se prepară în momentul întrebuinţării din 10 ml diazo I + 0,25 ml nitrit de sodiu diazo II.

Tehnica. Se iau 3 eprubete, nr. 1, 2 şi 3, în care se pun succesiv :

	Nr. 1 proba martor (ml)	Nr. 2 bilirubină totală (ml)	Nr. 3 bilirubină directă (ml)
Ser nehemolizat	1	1	1
Apă distilată	0,5	—	—
Soluţie cafeină	3,5	3,5	—
Reactiv Ehrlich	—	0,5	0,5
Clorură de sodiu	—	—	3,5

Se agită eprubetele, se lasă 5 minute la întuneric, apoi citirea se face la Pulfrich cu filtru S_{53} şi cuva de 1 cm.

mg bilirubină % = $E \times 6{,}34$.

Metoda Jouvençaux-Revol se bazează pe acelaşi principiu, ca şi metodele anterioare.

Reactivi : 1. Nitrit de sodiu 1% ; soluţia se diluează 0,5% în momentul întrebuinţării.

2. Soluţia A : se dizolvă 1 g acid sulfanilic în 500 ml apă care conţin 15 ml acid clorhidric concentrat ; după dizolvarea completă se aduce volumul cu apă distilată la 1 000 ml.

Pentru obţinerea reactivului diazo se amestecă 0,06 ml nitrit de sodiu 0,5% cu 2 ml soluţie A.

3. Benzoat de sodiu-uree (B.S.U.) : soluţia se obţine dizolvînd 25 g benzoat de Na în 60 ml apă distilată, se adaugă 15 g uree şi se aduce la volum de 100 ml. Reactivul se filtrează.

Tehnica de microdozare. Bilirubina directă.

1. Proba martor conţine : 0,1 ml ser de cercetat + 0,2 ml soluţie A + 0,7 ml apă distilată.

2. Proba de cercetat conţine : 0,1 ml ser de cercetat + 0,2 ml diazo-reactiv +0,7 ml apă distilată.

În proba de cercetat poate să apară o coloraţie roz. Culoarea indică prezenţa bilirubinei directe. Se adaugă probelor 1 ml apă distilată, se agită bine. Dozarea se face la fotometru în primul moment de la apariţia culorii. Rezultatele se citesc pe curba de etalonare.

Bilirubina totală. Se lucrează ca la punctul I, înlocuind 1 ml de apă cu 1 ml reactiv B.S.U. Rezultatul obținut reprezintă bilirubina totală. Cunoscînd valoarea bilirubinei directe și a bilirubinei totale se poate calcula bilirubina indirectă.

Bilirubina indirectă = bilirubina totală minus bilirubina directă.

În caz că nu există bilirubină directă se trece la dozarea bilirubinei totale, care reprezintă bilirubina indirectă.

Curba etalon: pentru aceasta sînt necesari următorii *reactivi*: — NaOH 10%;

— HCl 7%;

— soluție alcoolică de fenolftaleină 0,1%;

— hîrtie indicator;

— bilirubină pură;

— ser sanguin proaspăt nehemolizat și clar.

1. Soluție standard: la 40 mg bilirubină se adaugă 40 ml ser + picătură cu picătură NaOH 10% (circa 2 ml) pînă la dizolvarea completă a bilirubinei.

2. La 40 ml ser + cantitatea de NaOH întrebuințată la punctul 1 + cîteva picături fenolftaleină, se adaugă apoi (pînă dispare culoarea roșie) HCl 7%. Se continuă a se adăuga încet HCl, pînă cînd hîrtia indicatoare are același pH ca la serul normal. Se notează cantitatea de HCl utilizată. Cantitatea calculată de HCl se adaugă picătură cu picătură mereu agitînd.

3. Se trece soluția standard într-un flacon de 100 ml și se completează pînă la semn cu ser sanguin; se verifică din nou pH cu hîrtia indicator și se aduce pH la o valoare egală cu aceea a serului.

4. Se prepară o serie de eprubete cu diluțiile următoare de bilirubină:

Eprubeta 1 = 0 mg bilirubină % = ser uman simplu;
Eprubeta 2 = 4 mg bilirubină % = la 0,5 ml soluție standard se adaugă 4,5 ml ser;
Eprubeta 3 = 8 mg bilirubină % = la 0,5 ml soluție standard se adaugă 2 ml ser;
Eprubeta 4 = 16 mg bilirubină % = la 1 ml soluție standard se adaugă 1,5 ml ser;
Eprubeta 5 = 20 mg bilirubină % = la 1 ml soluție standard se adaugă 1 ml ser;
Eprubeta 6 = 24 mg bilirubină % = la 1,5 ml soluție standard se adaugă 1 ml ser;
Eprubeta 7 = 28 mg bilirubină % = la 3,5 ml soluție standard se adaugă 1,5 ml ser;
Eprubeta 8 = 40 mg bilirubină % = soluție standard.

5. Se aplică la cele 8 diluții tehnica de dozare descrisă mai sus.

În proba martor se pune 0,1 ml diluție de studiat + 0,2 ml soluție A + 0,7 ml apă distilată + 1 ml B.S.U.

În proba de cercetat se pune 0,1 ml din aceeași diluție de studiat + 0,2 ml diazo + + 0,7 ml apă + 1 ml B.S.U. Se fotocolorimetrează cele 8 probe, iar curba se trasează pe hîrtie milimetrică și este o dreaptă.

Micrometoda este utilizată pînă la 30 mg%; mai sus de această valoare, serul se diluează ținîndu-se seama la calcul de diluția făcută.

Tehnica de macrodozare. La adult bilirubinemia este mai mică decît la nou-născut.

În loc de a pune 0,1 ml de ser ca la micrometodă, aici se lucrează cu 0,8 ml ser și nu se mai adaugă 0,7 ml apă distilată. Pentru proba martor se adaugă picătură cu picătură 0,2 ml soluție A; pentru proba de cercetat se adaugă picătură cu picătură 0,2 ml soluție de reactiv diazo. Rezultatele obținute pe curba inițială sînt împărțite la 8.

Metoda spectrofotometrică. Bilirubina formează cu sărurile de diazoniu azo-coloranți, cu absorbția maximă la 530 µm.

Reactivi: 1. Soluția diazo A: se dizolvă 1 g acid sulfanilic în 1000 ml apă distilată, care conține 15 ml acid clorhidric concentrat.

2. Soluția diazo B: nitrit de sodiu 0,5%. Reactivul diazo: în momentul întrebuințării se amestecă 10 ml soluție diazo A cu 0,25 ml soluție diazo B.

3. Soluția de comparat: 15 ml acid clorhidric concentrat în 1 000 ml apă distilată.

4. Soluție de uree-benzoat: într-un balon cotat de 500 ml se dizolvă 50 g benzoat de sodiu chimic pur cu 300 ml apă distilată, se adaugă 50 g uree, se dizolvă și se completează cu apă distilată. Dacă soluția este tulbure trebuie filtrată.

Tehnica. Se pregătesc 2 eprubete una probă, și alta martor. În eprubeta pentru probă se măsoară 0,5 ml ser + 0,25 ml reactiv diazo + + 4,25 ml soluție de uree-benzoat (4).

În eprubeta pentru martor se măsoară 0,5 ml ser + 0,25 ml soluție de comparat (3) + + 4,25 ml soluție de uree-benzoat.

Ambele eprubete se agită puternic și apoi sînt lăsate în repaus 15 minute la întuneric. Aparatul se reglează la 530 mµ, se egalează cu soluția de comparat (3) și cuva de 1 cm la 100% transmisie. După reglarea aparatului se măsoară absorbția probei care este proporțională cu concentrația.

Din curba etalon se calculează concentrația probei de determinat.

Curba etalon se construiește cu ajutorul a 3 diluții obținute din soluția stoc de 40 mg bilirubină %.

Valori normale (% ml):
bilirubina totală = 0,4 — 1 mg;
bilirubina directă = 0—0,2 mg;
bilirubina indirectă = 0,2—1 mg.

Bilirubina indirectă este crescută în icterul hemolitic, boala Biermer, boala Gilbert, icterul fiziologic la nou-născuți și în unele cazuri de ciroză.

Procentajul bilirubinei indirecte în aceste cazuri se înscrie între 80 și 100%.

Bilirubina directă este crescută în icterul prin obstrucție, în icterul provocat de hepatita virală și în unele cazuri de ciroză. Procentajul bilirubinei libere în aceste cazuri se înscrie sub 20%.

Fracțiunea bilirubinei eterosolubilă. După Heilmayer, această componentă servește în diagnosticul diferențial dintre ocluzia malignă a căilor biliare și ocluzia prin calcul.

Această fracțiune se pune în evidență prin solubilitatea ei în eter.

Tehnica. Se recoltează dimineața pe nemîncate 5 ml sînge, se centrifughează, iar 1 ml ser clar și nehemolizat se amestecă cu 2 ml eter etilic și se agită puternic. Se lasă în repaus, iar citirea rezultatelor se face după 2 ore.

Dacă eterul supernatant este complet incolor, rezultatul este negativ.

Dacă eterul este colorat în verde deschis sau închis, rezultatul este pozitiv.

Fracțiunea bilirubinei benzeno-solubilă este bilirubina liberă sau bilirubina indirectă care se determină cantitativ cu metoda Rivoire.

Reactivi: 1. Soluție saturată de bromură de bariu.

2. benzen pur cristalizat.

3. bilirubină pură.

4. metanol alcalin: 90 ml metanol + 10 ml hidrat de sodiu N/10.

Tehnica. 2 ml ser proaspăt clar și nehemolizat sînt tratați cu 8 picături soluție saturată de bromură de bariu și 4 ml benzen. Se agită amestecul puternic 3 minute. Se centrifughează și se separă faza benzenică (faza superioară). Restul este tratat din nou cu 4 ml benzen, pentru o nouă extracție. Extincția celor două soluții benzenice se citește la fotometrul Pulfrich cu filtru S_{47}. Martor: solventul, adică benzenul. Cunoscînd extincțiile, cantitatea de bilirubină se citește pe curba etalon.

Totalul celor două valori obținute reprezintă cantitatea totală de bilirubină benzeno-solubilă. Cu o singură extracție se obține numai 75% din cantitatea totală de bilirubină benzeno-solubilă.

Prepararea soluțiilor etalon. Soluția stoc de bilirubină = 500 mg bilirubină la 1 000 ml. 25 mg bilirubină sînt dizolvate în 50 ml metanol alcalin. Din această soluție se prepară următoarele diluții în baloane cotate de 25 ml:

Mg bilirubină ‰	Martor	5	10	20
Soluție stoc 500 mg ‰ ml	—	0,25	0,50	1
Metanol alcalin ml	0,50	—	—	—
Clorură de sodiu 9 g ‰ ml	24,50	24,75	24,50	24

Toate diluțiile obținute sînt tratate ca și serul de cercetat cu bromură de bariu și benzen. Cu extincțiile citite și cu cantitățile de bilirubină cunoscute se construiește curba de etalonare.

Valorile normale se înscriu sub 10 mg bilirubină benzeno-solubilă la 1 000 ml ser.

Testul bilirubinemiei provocate constă în injectarea intravenoasă a unei soluții de bilirubină p.a. și determinarea bilirubinei în ser după injectare la anumite intervale de timp. Bolnavul nu trebuie să mănînce în timpul testului provocat.

Tehnica de determinare. Se recoltează întîi sînge pentru determinarea extincției serului martor. Se injectează apoi intravenos prin același ac, o soluție sterilă de 50 mg bilirubină p.a. dizolvată în 10 ml soluție carbonat de sodiu 5%. După 3 minute și după 4 ore de la injectarea soluției de bilirubină se recoltează prize de 5 ml sînge. Serurile recoltate clare și nehemolizate, sînt puse în cuvele de 5 cm și fotometrate cu filtru S_{47}. Cuva de compensare conține serul martor. Extincțiile citite sînt E și E_1.

E = extincția serului recoltat după 3 minute;

E_1 = extincția serului recoltat după 4 ore.

Exemplu: $E = 0{,}52$
$E_1 = 0{,}10$

Calcul: bilirubina prezentă încă după 4 ore $= \frac{E_1 \times 100}{E} = \frac{0{,}10 \times 100}{0{,}52} = 19{,}2\ \%$.

În mod normal, creşterea bilirubinemiei nu mai reprezintă după 4 ore decît maximum 10% din creşterea bilirubinei totale, adică din cantitatea de bilirubină determinată după 4 minute de la injectarea soluţiei de bilirubină. Valori mai ridicate de 15% după 4 ore indică o leziune a parenchimului hepatic.

Cu ajutorul acestui test se pot depista bine cazurile anicterice şi se pot obţine rezultate utile pentru diagnosticul funcţional în hepatitele reziduale, în care retenţia de bilirubină poate atinge valori de 10-70%, cu toată vindecarea clinică aparentă.

Serurile recoltate ca în metoda de mai sus pot fi şi colorimetrate cu ajutorul colorimetrului Duboscq. Aprecierea rezultatelor se face comparativ cu o soluţie de bicromat de K 1%. Cuva cu soluţia de bicromat de K se fixează la diviziunea 10.

Exemplu: pentru proba de control, ser martor, se citeşte diviziunea 20; pentru proba după 4 minute se citeşte diviziunea 6; pentru proba după 4 ore se citeşte diviziunea 15.

Se împarte 10 (scara fixă a soluţiei de comparat) la valorile citite.

Proba de control = 0,5.
Proba de la 4 minute = 1,7.
Proba de la 4 ore = 0,7.

Valoarea probei de control se scade din valorile probelor de la 4 minute şi 4 ore.

Proba de la 4 minute = 1,7−0,5 = 1,2.
Proba de la 4 ore = 0,7−0,5 = 0,2.

Valoarea probei de la 4 minute după injectarea soluţiei de bilirubină se egalează cu 100. Aplicînd regula de trei simplă se determină cantitatea de bilirubină prezentă după 4 ore de la injectare.

1,2....100
0,2....x   x = 16%

Valoarea explorării pigmenţilor biliari în clinică

Circuitele metabolice ale bilirubinei şi derivaţilor săi sînt alterate de afecţiunile hepatice. În icterul hemolitic, SRE distruge multă Hb, astfel că în compartimentul vascular găsim bilirubin-albumină (BRI) crescută. La nivelul ficatului se elimină prin bilă o cantitate crescută de bilirubină conjugată (BRD), astfel că în fecale vom găsi stercobilinogenul mărit. Circuitul entero-hepatic va fi accentuat, se resoarbe activ urobilinogen, ceea ce va duce la eliminarea sa masivă în urină.

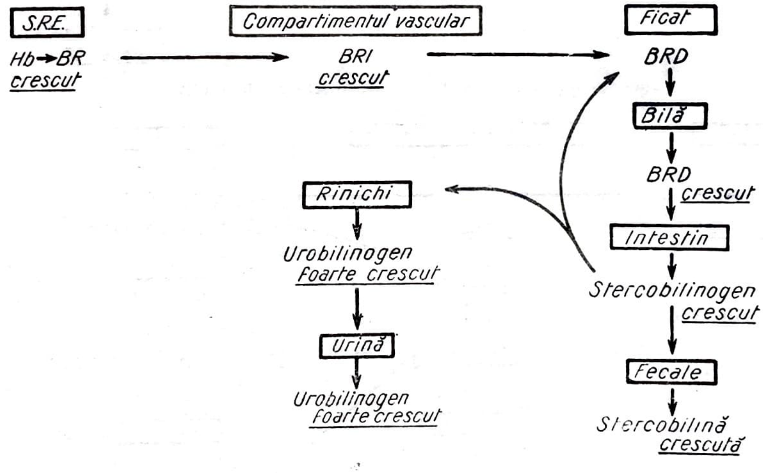


Fig. — 74. Circuitul bilirubinei în icterul hemolitic.

În icterul obstructiv, producerea de bilirubină în sistemul reticulo-endotelial este normală, astfel că BRI în compartimentul vascular va fi în limitele fiziologice. Din cauza obstacolului biliar însă, BRD produsă în ficat nu se va putea elimina şi va trece în circulaţie, unde va atinge valori crescute, trecînd apoi în urină. Circuitul enterohepatic va fi nul, iar la nivelul intestinului şi al fecalelor stercobilinogenul este absent.

În hepatită, producerea de BR în SRE este normală, BRI în compartimentul vascular însă este crescută, deoarece ficatul este deficitar, iar conjugarea ei, eliminarea bilirubinei prin bilă, se face insuficient. La nivelul bilei, BRD va fi scăzută — producerea de bilirubină directă ajungînd toată în plasmă, unde

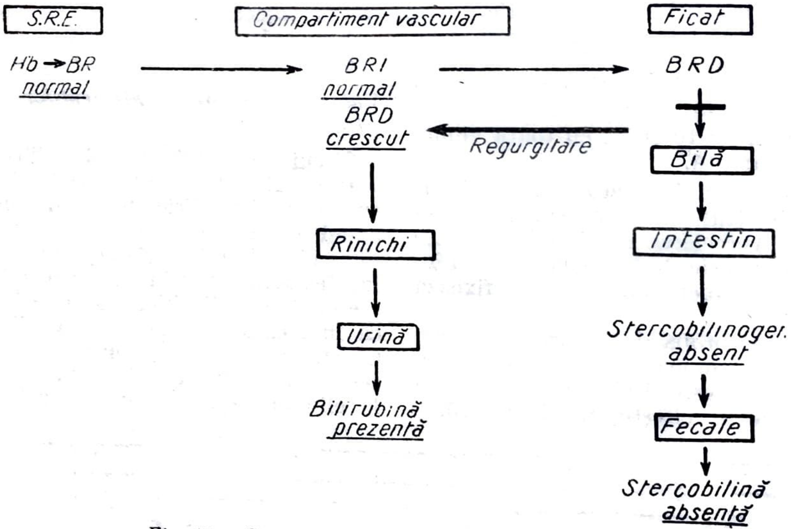

S.R.E.
Compartiment vascular
Ficat
Hb → BR
normal
BRI
normal
BRD
crescut
BRD
Regurgitare
Bilă
Rinichi
Intestin
Urină
Stercobilinogen
absent
Bilirubină
prezentă
Fecale
Stercobilină
absentă

Fig. 75. — Circuitul bilirubinei în icterul obstructiv.

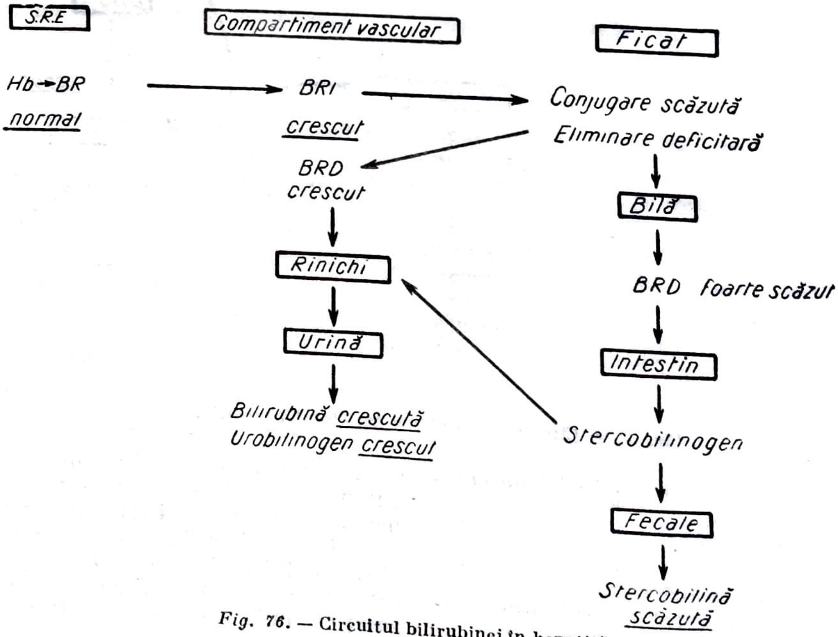

S.R.E.
Compartiment vascular
Ficat
Hb → BR
normal
BRI
crescut
Conjugare scăzută
Eliminare deficitară
BRD
crescut
Bilă
Rinichi
BRD foarte scăzut
Urină
Intestin
Bilirubină crescută
Urobilinogen crescut
Stercobilinogen
Fecale
Stercobilină
scăzută

Fig. 76. — Circuitul bilirubinei în hepatită.

BRD va fi și ea crescută, ca și BRI. La nivelul fecalelor, stercobilina este scăzută, în schimb în urină vom găsi urobilinogen (deviat din circuitul entero-hepatic, ficatul nefiind capabil să-l transforme) și bilirubina care a traversat filtrul renal.

ROLUL FICATULUI ÎN METABOLISMUL GLUCIDIC

Principalele funcții ale ficatului în metabolizarea glucidelor sînt legate de:

1. Păstrarea echilibrului între glicogenogeneză, glicogenoliză și gluconeogeneză, avînd ca urmare menținerea homeostaziei glicemiei, împreună cu ceilalți factori extrahepatici.

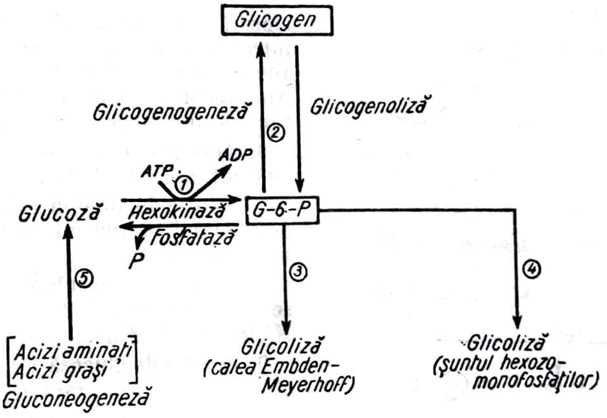


Fig. 77. — Căile metabolice ale glucozo-6-fosfatului.

2. Conversiunea hexozelor neglucozice (fructoză, galactoză) la glucoză.

3. Asimilarea CO_2.

Intervenția hepatică în metabolismul glucidic se face prin intermediul glucozo-6-fosfatului (G-6-$\boxed{P}$), rezultat din fosforilarea glucozei la carbonul 6 cu ajutorul ATP, sub influența enzimei hexokinaza (1).

G-6-$\boxed{P}$ poate fi condensat în glicogen — *glicogenogeneza* (2) sau metabolizat — *glicoliza*. Degradarea se poate face pe calea clasică Embden-Meyerhoff (3) sau deviat, prin șuntul hexozomonofosfaților (4). La nivelul ficatului reacția hexokinazică este reversibilă datorită unei fosfataze specifice. Astfel, din glicogen, ficatul poate forma glucoză, ceea ce celelalte țesuturi, lipsite de fosfataza respectivă, nu pot face. Ele sînt nevoite a metaboliza G-6-$\boxed{P}$ numai spre acid piruvic și acid lactic. Tot în ficat are loc și conversiunea substanțelor neglucidice — cum ar fi acizii grași și aminoacizii glucoformatori — la glucoză.

Fenomenul poartă numele de gluconeogeneză (5). Șuntul HMP începe la nivelul G-6-$\boxed{P}$ printr-o oxidare cu TPN (trifosfopiridin-nucleotid) — reacția a — formînd acidul 6-$\boxed{P}$-gluconic. O nouă oxidare cu TPN — reacția b — duce la acidul 3-keto-6-$\boxed{P}$-gluconic care prin decarboxilare — reacția c — formează ribulozo-5-$\boxed{P}$. Pornind de la 3 molecule de glucoză, obținem 3 molecule de ribulozo-5-$\boxed{P}$ și 3 de CO_2.

Din 2 molecule de ribulozo-5-$\boxed{P}$, din care una izomerizată la ribulozo-5-$\boxed{P}$ se formează prin condensare (1) sedoheptulozo-7-$\boxed{P}$ și 3-$\boxed{P}$-gliceroaldehida (1^a și 1^b).

Sedoheptulozo-7-$\boxed{P}$ se desface (2) în eritrozo-4-$\boxed{P}$ și dioxiacetonfosfat (2^a și 2^b). 3-$\boxed{P}$ gliceroaldehida, împreună cu dioxiacetonfosfatul (3) formează fructozo-6-$\boxed{P}$ (reacția 3^a).

A 3-a moleculă de ribulozo-5-$\boxed{P}$ se condensează cu eritrozo-4-$\boxed{P}$ (reacția 4) și formează o moleculă de fructozo-6-$\boxed{P}$ (reacția 4^a) și una de 3-$\boxed{P}$-gliceroaldehidă (4^b).

Bilanțul total al șuntului este:

3 molecule de glucoză $= 3CO_2 + 2$ fructozo-6-$\boxed{P}$ $+ 1$-3-$\boxed{P}$-gliceroaldehidă.

Aceste considerente reprezintă baza teoretică a explorării de laborator pentru testele determinărilor de glucoză.

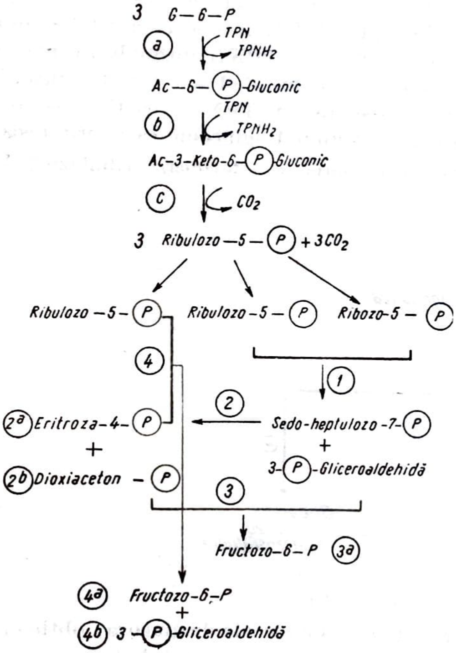


Fig. 78. — Șuntul hexozo-monofosfaților.

Dozarea glucozei în sînge

Determinarea cantitativă a glucozei se face pe sînge total. Sîngele se recoltează pe fluorură de sodiu, în proporție de 5 ml sînge + 0,25 g fluorură de sodiu. Fluorura de sodiu are proprietatea de a împiedica, atît coagularea, cît și glicoliza. Proba de sînge se lucrează imediat sau cel mult după o conservare de 24 de ore la + 4°.

Micrometoda Hagedorn-Jensen. În mediul alcalin, la fierbere, fericianura de potasiu este redusă de glucoză în ferocianură, iar excesul de fericianură se poate determina pe cale iodometrică.

Reactivi : 1. Hidroxid de sodiu N/10 (4 $g^{0}/_{00}$).

2. Sulfat de zinc (soluție stoc). În 100 ml apă se dizolvă 45 g SO_4Zn. $7H_2O$. În momentul întrebuințării se diluează 1/100.

3. Soluție alcalină de fericianură de potasiu N/20. Soluția stoc : se dizolvă 16,5 g fericianură de potasiu și 106 g carbonat de sodiu anhidru la 1 000 ml apă distilată. Soluția fericianură N/200 : 1 ml din soluția N/20 + 9 ml apă distilată.

4. Sulfat de zinc — clorură de sodiu. Se dizolvă 50 g sulfat de zinc și 250 g clorură de sodiu p.a. în 1 000 ml apă distilată.

5. Iodură de potasiu — sulfat de zinc — clorură de sodiu. Se dizolvă în momentul întrebuințării 2,5 g iodură de potasiu în 100 ml soluție sulfat de zinc — clorură de sodiu. Amestecul se poate conserva cel mult o săptămînă în sticlă colorată.

6. Acid acetic 3% (3 ml acid acetic 99% la 100 ml apă distilată).

7. Soluție de amidon 1%. Se dizolvă 1 g amidon solubil în 100 ml soluție saturată de clorură de sodiu.

8. Soluție de tiosulfat de sodiu N/200, care se conservă numai 2-3 zile (soluția stoc este N/20) (12,5 $g^{0}/_{00}$).

9. Soluție de glucoză 1/1 000 ; reactiv necesar cînd se calculează fără tabele.

10. Iodat de potasiu N/200 (soluția stoc este N/20) (1,78 $g^{0}/_{00}$).

Tehnica. Pentru rezultate sigure se fac totdeauna probe duble.

a) Se numerotează o serie de eprubete de 18/180 cu numărul probelor de analizat, adăugînd în plus 2 eprubete notate, una martor în alb și cealaltă martor glucoză soluție 1$^{0}/_{00}$. Martorii se lucrează identic ca probele. În fiecare eprubetă se pune 1 ml hidroxid de sodiu N/10 + 5 ml sulfat de zinc 0,45%. Se formează un precipitat gelatinos de hidroxid de zinc care servește la defecarea sîngelui total. Se adaugă apoi 0,1 ml sînge cu o micropipetă și se spală de cîteva ori pipeta, aspirînd și suflînd precipitatul gelatinos de hidroxid de zinc din eprubetă. Se pun toate eprubetele pe un stativ, se introduc într-o baie de apă clocotită și se fierb 3 minute. Între timp se așază același număr de eprubete Hagedorn numerotate cu numărul probelor de analizat. Pe fiecare eprubetă se află cîte o pîlnie cu diametrul de 3—4 cm, prevăzute cu pîlnii de filtru.

Atît filtrele, cît şi eprubetele se spală de cîteva ori cu apă bidistilată fierbinte pentru eliminarea substanţelor reductoare existente. La sfîrşitul celor 3 minute se scot eprubetele din baia de apă şi se filtrează cantitativ conţinutul fiecărei eprubete prin filtrele pregătite în eprubeta Hagedorn corespunzătoare. Se spală de 2—3 ori cu apă distilată fierbinte eprubetele în care s-a făcut deproteinizarea, precum şi precipitatul rămas în pîlnie, pentru a nu avea pierdere de substanţă reductoare.

Apoi se îndepărtează pîlniile şi se adaugă filtratului care conţine glucoza din sînge 2 ml soluţie alcalină de fericianură de potasiu, măsurată foarte exact. Se agită uşor, se introduc eprubetele într-o baie de apă clocotită şi se fierb 15 minute. După răcire la curent de apă se adaugă 3 ml din reactivul iodură de potasiu — sulfat de zinc — clorură de sodiu + 2 ml acid acetic 3% + 4 picături de soluţie amidon 1%.

Se titrează cu o microbiuretă toate eprubetele, inclusiv martorii cu tiosulfat de sodiu N/200 pînă la dispariţia culorii albastre.

De exemplu: martorul în alb = 1,90 ml tiosulfat N/200.

Martorul glucoză 0,1 $g^0/_{00}$ = 1,40 ml tiosulfat N/200.

Soluţia de cercetat = 1,20 ml tiosulfat N/200.

Se scad cifrele obţinute la titrare din 2 ml de fericianură de potasiu:

Martor în alb: 2—1,90 = 0,10.

Glucoză 0,1$^0/_{00}$: 2 — 1,40 = 0,60.

Proba de cercetat: 2—1,20 = 0,80.

Atît din martorul cu glucoză, cît şi din proba de cercetat se scade martorul în alb.

Glucoza 1$^0/_{00}$ = 0,60 — 0,10 = 0,50 ml.

Proba de cercetat 0,80—0,10 = 0,70 ml.

Calcul: 0,1 glucoză $^0/_{00}$ . . . . . 0,50 ml tiosulfat de sodiu N/200

x glucoză . . . . 0,70 ml tiosulfat de sodiu

$x = \frac{0,1 \times 0,70}{0,50} = 0,14$ mg glucoză în 0,1 ml sînge sau 1,40 g glucoză la 1 000 ml sînge.

Calculul prin tabele. Calculul prin tabele se face scăzînd cantitatea de glucoză corespunzătoare probei în alb din cantitatea de glucoză corespunzătoare filtratului de sînge. Diferenţa obţinută exprimă cantitatea de glucoză la 100 ml sînge de cercetat.

TABELUL 50

Tabel pentru microdozări de zahăr Hagedorn-Jensen
(ml tiosulfat N/200=mg% glucoză)

Ml tiosulfat N/200	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	335
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	104	102	101	099	097	095	093	092	090
1,5	088	086	084	083	081	079	077	075	074	072
1,6	070	068	066	065	063	061	059	057	056	054
1,7	052	050	048	047	045	043	041	039	038	036
1,8	034	032	031	029	027	025	024	022	020	019
1,9	017	015	014	012	010	008	007	005	003	002

Metoda colorimetrică cu antronă. Glucoza dă cu antrona un complex colorat, a cărui extincţie se citeşte la fotometrul Pulfrich cu filtrul 620 mμ.

Reactivi: 1. Acid tricloracetic 10%.

2. Antronă-tiouree în acid sulfuric 66%.

Într-un balon de 1 000 ml se pun 340 ml apă distilată, apoi picătură cu picătură 600 ml acid sulfuric concentrat p.a. D=1,84; amestecul se răceşte la curent de apă. Într-alt balon cotat de 1 000 ml se pun circa 800 ml acid sulfuric 66% şi se adaugă 500 mg antronă + 10 g tiouree pură. Se încălzeşte la 80° pentru dizolvarea completă a substanţei şi se aduce la semn cu acid sulfuric 66%. Reactivul se poate conserva la +4° în sticle brune timp de 10—15 zile.

3. Soluţie-etalon de glucoză 2 $g^0/_{00}$.

Curba de etalonare. Din soluţia 2$^0/_{00}$ se fac o serie de diluţii, cu următoarele concentraţii: 1,80; 1,60; 1,40; 1,20; 1,00; 0,80 şi 0,60 g glucoză $^0/_{00}$. Din aceste diluţii se ia 1 ml şi se tratează cu reactivul antronă-tiouree, ca şi proba de analizat. Cu extincţiile citite la fotometru şi cu concentraţiile cunoscute se construieşte curba de etalonare.

Tehnica. 1 ml sînge (recoltat pe fluorură de Na) se tratează cu 9 ml acid tricloracetic 10%.

Se agită și se filtrează. Se iau două eprubete numerotate 1 și 2. Se pune 1 ml filtrat în eprubeta nr. 1, și 1 ml apă distilată în eprubeta nr. 2. Se adaugă în fiecare eprubetă cîte 10 ml reactiv antronă-tiouree, se acoperă eprubetele cu cîte o pîlnie mică și se fierb 15 minute pe baie de apă. Se folosește o baie metalică, iar în timpul fierberii, eprubetele sînt cufundate în vată pentru a fi ferite de lumină. Eprubetele se răcesc, iar după 20–30 de minute probele ținute la întuneric se citesc la fotometrul Pulfrich cu filtru 620 mμ și cuva de 1 cm. Se raportează valoarea extincției la curba de etalonare și se obține rezultatul în mg/100 ml ser. Dacă proba conține o cantitate de glucoză mai mare de 0,2 mg/ml trebuie ca filtratul să se dilueze cu apă distilată și se va ține seama la calcul de gradul diluției.

Valori normale: 70–120 mg%.

Valori crescute: în diabet, stări febrile, tumori și leziuni cerebrale, injecții cu adrenalină, hipersecreție de adrenalină, tumori ale glandei suprarenale.

Valori scăzute: în hiperinsulinism, hipertiroidism, atrofia galbenă a ficatului etc.

Metoda „Nelson". Zaharurile, în prezența sărurilor de cupru, dau cu reactivul arseno-molibdenic un complex albastru, a cărui intensitate se determină colorimetric.

1. *Reactiv alcalino-cupric*:

Fosfat disodic anhidru	28 g.
Hidroxid de sodiu N	100 ml.
Sare Seignette (tartrat dublu de Na și K)	40 g.
Sulfat de cupru + $5\,H_2O$	8 g.
Sulfat de sodiu anhidru	80 g.

Se dizolvă în 700 ml apă fosfatul disodic și tartratul. Se adaugă hidroxidul de sodiu, apoi sulfatul de cupru și sulfatul de sodiu. După dizolvarea lor se completează volumul la 1 000 ml cu apă distilată. În 2–3 zile, la 37°, reactivul lasă un depozit pe fundul vasului, de aceea trebuie filtrat. Reactivul se conservă în sticle brune la temperatura laboratorului.

2. *Reactiv arseno-molibdenic*:

Molibdat de amoniu	25 g.
Apă distilată	450 ml.
Acid sulfuric concentrat	21 ml.

După dizolvarea molibdatului de amoniu se adaugă 3 g arseniat disodic dizolvat în 25 ml apă distilată. Reactivul se ține 48 de ore la 37°. Culoarea reactivului este verde, prin adăugarea a 2–3 ml permanganat de potasiu N/20, reactivul capătă o culoare galben-roșcată. Se conservă la întuneric.

3. Soluția standard de glucoză 1 g‰; din această soluție de 1‰ se prepară două diluții de 0,1 și 0,05 g glucoză ‰.

4. Reactiv defecant : tungstat de sodiu 10%;
acid sulfuric 1.5 N

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 15 ml apă distilată; 1 ml sînge, 2 ml tungstat de sodiu 10% și 2 ml acid sulfuric 1.5 N. Se agită puternic și apoi se centrifughează. Din supernatant se iau 0,5 ml pentru a determina cantitatea de glucoză.

Se pregătesc 4 eprubete în care se măsoară (ml):

	Nr. 1 Proba de determinat	Nr. 2 Proba albă	Nr. 3 Proba etalon 0,05‰	Nr. 4 Proba etalon 0,1‰
Supernatant	0,5	—	—	—
Apă distilată	—	0,5	—	—
Glucoză 0,05‰	—	—	0,5	—
Glucoză 0,1‰	—	—	—	0,5

Toate tuburile sînt fierte timp de 20 de minute, răcite și apoi în fiecare tub se adaugă 0,5 ml reactiv arseno-molibdenic și 4,5 ml apă distilată.

Citirea se face la fotocolorimetrul cu filtru S_{650} mμ cuva de 0,5 cm.

Citirea se poate face și la spectrofotometru cu filtrul 540 mμ cuva de 1 cm; aparatul se reglează cu proba 2 și apoi se măsoară absorbția probei de determinat și a probelor-etalon.

Metoda Nelson se poate aplica și pe 0,1 ml sînge, adăugînd în acest caz 1,5 ml apă, 0,5 ml tungstat de sodiu 10% și 0,2 ml acid sulfuric 1.5 N. Se continuă tot cu 0,5 ml supernatant, la fel ca în metoda de dozare cu 1 ml sînge.

Determinarea glicozuriei

În urina patologică se pot întîlni diverse zaharuri ca: glucoza, levuloza, galactoza, pentoza etc. Într-o urină normală, aceste glucide se găsesc în cantități extrem de mici, încît nu pot fi puse în evidență prin metode calitative. După ingerarea de anumite medicamente, urina poate de asemenea prezenta o oarecare putere reductoare prin formare de compuși glicuronici.

Albumina, pigmenții biliari, creatinina, acidul uric în cantități mari dau false reacții. Pentru a se înlătura aceste inconveniente, urina, trebuie defecată, operație realizabilă prin reactivul Courtonne și reactivul Patein.

Reactivul Courtonne: 1. Acetat neutru de plumb 300 g. 2. Apă distilată *ad* 1 000 ml.

Se dizolvă acetatul de plumb în 800 ml apă distilată şi se adaugă acid acetic, picătură cu picătură, pînă la obţinerea unei soluţii neutre faţă de turnesol; se completează cu apă distilată la 1 000 ml.

Tehnica. Se pune reactiv Courtonne în proporţie de 10% faţă de urină, se amestecă cu o baghetă de sticlă, se agită şi se filtrează pînă ce filtratul este limpede.

Pentru dozările curente de glucide, deproteinizarea cu acetat de plumb este suficientă. Pentru cercetări se face deproteinizarea urinii cu reactiv Patein.

Reactivi: 1. Hidroxid de sodiu 10%.

2. Acid acetic 10%.

3. Zinc pulbere.

Reactivul Patein: într-o capsulă de porţelan se dizolvă 200 g oxid roşu de mercur în 160 ml acid azotic pur, D=1,40. Se agită puternic cu o baghetă de sticlă, pentru a împiedica formarea de grunji. După 5—6 minute de agitare se adaugă 150 ml apă distilată şi se încălzeşte la fierbere pînă la dizolvarea totală. Se lasă să se răcească şi se adaugă cu precauţie 10 ml hidroxid de sodiu 30%, agitînd tot timpul. Se trece conţinutul într-un balon cotat de 1 000 ml şi se completează cu apă.

Tehnica. Într-un pahar de 100 ml se amestecă 50 ml urină + 25 reactiv Patein. Se agită puternic şi se adaugă picătură cu picătură circa 20 ml hidrat de sodiu 10% pînă la neutralizare faţă de hîrtia de turnesol. Dacă culoarea a fost depăşită se reduce cu acid acetic 10%. Se trece într-un balon cotat de 100 şi se completează cu apă distilată la 100 ml. Se filtrează; filtratul care reprezintă o diluţie de 1/2 este incolor şi neutru. Pentru a elimina mercurul se tratează filtratul cu 1 g pulbere de zinc şi se agită cam 3—4 ore. Se filtrează din nou şi se aduce filtratul la reacţia alcalină faţă de turnesol cu hidroxid de sodiu 10%. Urinile bolnavilor trataţi cu insulină vor fi defecate numai cu reactiv Patein, altfel reacţia de reducere a soluţiei Fehling nu este netă.

Urinile bogate în albumină împiedică dozările de glucoză. Îndepărtarea albuminei se face în felul următor: se adaugă la urină cîteva picături de acid acetic 10% şi se fierbe. Se îndepărtează precipitatul prin filtrare sau centrifugare şi apoi se fac determinările calitative şi cantitative cu metodele Fehling, Benedict, Ionescu-Matiu.

Metode calitative

Metoda Fehling. Glucoza prin funcţia ei aldehidică în mediu alcalin reduce hidroxidul de cupru în suboxid de cupru de culoare roşie-cărămizie.

Reactivi: Fehling I: sulfat de cupru cristalizat 35 g + 5 ml acid sulfuric concentrat, D = 1, 84, se completează cu apă distilată pînă la 1 000 ml.

Fehling II: tartrat dublu de sodiu şi potasiu 150 g + 300 ml, soluţie hidroxid de sodiu 30%, se completează cu apă distilată pînă la 1 000 ml.

În momentul întrebuinţării se amestecă, în proporţii egale, Fehling I cu Fehling II.

Tehnica. Într-o eprubetă se introduc 2 ml urină, 2 ml amestec Fehling şi 4—5 ml apă distilată pînă la obţinerea unei tente albastru-deschis şi apoi se încălzeşte la fierbere.

Rezultate. Prezenţa de glucoză dă o coloraţie roşie-oranj. În cazul cînd apare o coloraţie verzuie-galbenă se repetă reacţia cu urină deproteinizată.

Sensibilitatea metodei este de 4 g glucoză/litru.

Streptomicina eliminată prin urină dă reacţie pozitivă cu reactivul Fehling.

Pentru determinarea calitativă a glucozei în urină în serie, se introduc eprubetele cu urină şi reactiv în baia de apă la fierbere timp de 3—5 minute şi apoi se examinează rezultatul.

Metoda Nylander se bazează pe proprietatea funcţiei aldehidice a glucozei de a reduce azotatul de bismut în bismut metalic de culoare neagră.

Reactiv Nylander:

Hidroxid de sodiu	100 g
Sare Seignette	40 g.
Azotat de bismut	20 g.
Apă distilată	1 000 ml.

Tehnica. La 10 ml urină defecată cu reactiv Patein sau Courtonne se adaugă 1 ml reactiv Nylander, se agită şi se ţine 7 minute în baia de apă, la fierbere. În prezenţa glucozei, azotatul de bismut este redus în bismut metalic negru. Reacţia este foarte sensibilă, însă atunci cînd este pozitivă trebuie controlată cu reacţia Fehling sau Benedict. Precipitatul negru de bismut metalic poate fi dat şi de sulfura de bismut formată de unele substanţe care conţin sulf, ca cistina, albumina şi care sînt eliminate prin urină.

Metoda Benedict foloseşte reactivul Benedict : a) într-un balon de 200 ml se face o soluţie de 17,3 g sulfat de cupru cristalizat în 100 ml apă distilată; b) într-un balon de 1 000 ml se dizolvă 100 g carbonat de Na anhidru (sau 200 g carbonat de sodiu cristalizat) + 173 g citrat trisodic şi 700 ml apă distilată.

Soluţiile se încălzesc pe flacără pînă la dizolvarea perfectă. Se răcesc la temperatura camerei şi se amestecă soluţia *a* cu *b*, agitînd vasul tot timpul. Se completează la 1 000 ml cu apă distilată.

Tehnica. La 5 ml reactiv Benedict se adaugă 0,5 ml urină. Se fierb 3 minute sau se pune în baia de apă la fierbere 5 minute. Se lasă să se răcească la temperatura camerei. Dacă urina nu conţine glucoză, culoarea reactivului nu se modifică. În prezenţa glucozei apare un precipitat verzui, galben sau roşu în raport cu concentraţia glucozei : pentru 0,5 — 0,6 g glucoză, culoarea este verzuie. Pentru 1 g% este galbenă, iar cînd concentraţia este peste 2 g%, culoarea este roşie. Această apreciere este aproximativă şi serveşte pentru o eventuală diluţie a urinii.

Metode cantitative

Metoda cu fericianură de potasiu (metoda Ionescu-Matiu). O soluţie alcalină de fericianură de potasiu este redusă de glucoză în ferocianură de potasiu. După ce toată cantitatea de fericianură a fost redusă, glucoza acţionează asupra acidului picric de culoare galbenă, care are rol de indicator, transformîndu-l în acid picramic roşu.

Reactivi : 1. Fericianura de potasiu 46 g, hidrat de sodiu 46 g, apă distilată *ad* 1 000 ml. 2. Soluţie saturată de acid picric 1,2 g%. 3. Soluţie de glucoză 5‰ (înainte de cîntărire, glucoza se usucă la 100° pînă la greutatea constantă).

Titrul soluţiei : într-un Erlenmeyer se pun pe rînd : 10 ml fericianură de potasiu, 10 picături de acid picric, 20 ml apă distilată şi se încălzeşte pînă la fierbere. Dintr-o biuretă sau pipetă gradată se lasă să picure glucoză 5‰, pînă ce culoarea galbenă virează spre roşie-cărămizie.

Dacă s-au folosit 5 ml din soluţia de glucoză 5‰, cantitatea de glucoză necesară pentru reducerea reactivului este de 0,05 g·*F* = factorul soluţiei este egal cu 0,05.

Tehnica. Într-un Erelnmeyer se măsoară : 10 ml de fericianură de potasiu, 10 picături de acid picric şi 20 ml apă distilată ; se încălzeşte pînă la fierbere. Dintr-o biuretă sau pipetă se lasă să picure urina de cercetat deproteinizată, pînă ce culoarea galbenă virează spre roşie-cărămizie.

Calcul : $\text{glucoză g/l urină} = \frac{F \times 1000}{N}$

$F = 0{,}05$.

N = numărul de ml urină întrebuinţaţi la titrare.

Rezultatul se înmulţeşte cu 1,1 sau cu 2, după cum urina a fost deproteinizată cu reactiv Courtonne sau Patein. Se ţine de asemenea seama şi de diluţia urinii.

Metoda Benedict este o metodă cantitativă mai sensibilă decît metoda Fehling şi Ionescu-Matiu.

Reactivi : 1. Carbonat de sodiu anhidru 6 g sau cristalizat 15 g.

2. Glucoză 1% ; cîntărirea să fie precisă.

3. Talc.

4. Ferocianură de potasiu 5% :

5. Reactiv Benedict : a) într-un balon cotat de 1 000 ml se pun : 100 g carbonat de sodiu anhidru + 200 g citrat trisodic sau tripotasic + 125 g sulfocianură de potasiu. Se dizolvă la cald în 800 ml apă distilată, se aduce la semn şi se filtrează ; b) într-un balon de 100, ml se dizolvă în apă distilată 18 g sulfat de cupru cristalizat cu 5 molecule de apă. Se amestecă soluţia *a* cu *b*.

Reactivul Benedict. Se amestecă încet soluţia *b* cu *a*, agitînd tot timpul, şi se adaugă 5 ml din soluţia de ferocianură de potasiu 5%. După răcire se completează pînă la 1 000 ml cu apă distilată. Cîntărirea sulfatului de cupru trebuie să fie precisă, deoarece soluţia este calculată astfel ca 25 ml reactiv să fie reduşi de 50 mg glucoză. Reactivul este stabil şi se poate păstra multă vreme.

Reactivul astfel preparat este redus de 50 mg glucoză, 52 mg levuloză, 54 mg galactoză şi 67 mg lactoză.

Tehnica. Într-un balon Erlenmeyer se măsoară : 25 ml reactiv Benedict şi se adaugă 15 g carbonat de sodiu cristalizat sau 6 g carbonat de sodiu anhidru şi puţin talc sau piatră ponce, pentru ca lichidul să nu facă spumă. Se încălzeşte la fierbere. Cînd tot carbonatul s-a dizolvat se adaugă urina de cercetat dintr-o biuretă sau pipetă gradată agitînd amestecul din balon. Urina, la început, se adaugă în cantitate mai mare pînă ce apare un precipitat albicios, apoi picătură cu picătură pînă la dispariţia culorii albastre. Punctul final al titrării la urină, datorită pigmenţilor urinari, este galben-verzui, spre deosebire de soluţia de glucoză unde se produce o decolorare totală. În tot timpul titrării, soluţia trebuie să fiarbă; în cazul cînd soluţia devine prea concentrată se adaugă apă distilată. Dacă urina conţine o cantitate mare de glucoză, se diluează 1/5 sau 1/10.

Calcul: glucoză g/l $= \frac{F \times 1000}{N}$ unde:

$F = 0{,}050$ g glucoză;

$n =$ numărul de ml de urină nediluată utilizată la titrare;

glucoză g la litru de urină $= \frac{0{,}05 \times 1\,000}{n}$

Metoda Fehling. Principiul şi reactivii sînt aceiaşi ca şi la metoda calitativă.

Tehnica. Într-un balon Erlenmeyer de 100 ml se pun: 10 ml soluţie Fehling I + 10 ml soluţie Fehling II + 20 ml apă distilată. Se aduce la fierbere şi se titrează cu urina deproteinizată sau cu urina diluată 1/5 — 1/10. Urina se adaugă picătură cu picătură, pînă cînd culoarea soluţiei din balonul Erlenmeyer trece în galben.

Calcul: glucoză g/l urină $= \frac{F \times 1\,000}{n}$ unde:

$F =$ factorul soluţiei Fehling determinat faţă de o soluţie 1% glucoză;

$n =$ numărul de ml de urină întrebuinţaţi la titrare pentru reducerea soluţiei Fehling.

La calcul se ţine seama de diluţia urinii. Urina nu trebuie să conţină mai mult de 1%, în caz contrar se va dilua cu apă distilată.

Procedeul polarimetric. Este bazat pe deviaţia luminii polarizate produsă de substanţe optic active. Aparatele servesc pentru dozarea rapidă a glucozei sau pentru diferenţierea de alte zaharuri reductoare. Astfel, glucoza este dextrogiră, pe cînd levuloza este levogiră. De asemenea, o serie întreagă de susbstanţe deviază lumina polarizată într-o măsură mai mică, ca: galactoza, maltoza, lactoza, zaharoza, acidul glicuronic, proteinele, acidul oxibutiric. Urina cu care se lucrează va fi deproteinizată. Urina deproteinizată trebuie să fie perfect clară, eventual va fi diluată. Prezenţa albuminei care este levogiră deranjează. Ea trebuie îndepărtată prin căldură cu acid tricloracetic şi filtrată.

Verificarea gradelor zaharimetrice. Se face o soluţie de 16,39 g zaharoză la 100 ml apă distilată. Această soluţie la 15° produce o rotaţie de 100° zaharimetrice.

Tehnica. Se verifică punctul 0 al aparatului, introducînd în tubul de probă apă distilată. Pentru dozare se umple tubul cu urină defecată. Dacă substanţa este dextrogiră, jumătatea dreaptă a cercului va fi mai întunecată. Dacă este levogiră, jumătatea stîngă a cercului va fi mai întunecată. Prin mişcarea şurubului se obţine o iluminare perfect identică a celor două jumătăţi ale cercului. Se citeşte numărul de grade zaharimetrice la care se adaugă şi cele de pe vernier. Se reface de trei ori lectura şi se face media.

Anumite aparate posedă o gradaţie exterioară în grade şi minute. 1° polarimetric = 4°615 zaharimetrice.

Un grad zaharimetric este egal cu 2,065 g glucoză la litru, cînd se lucrează cu un tub de 20 cm. La calcul se va ţine seama de diluţia urinii.

Glucoza în g/l = gradele găsite × 2,478; calculul este făcut pentru temperatura de 15°; glucoza este mai puţin influenţată de variaţiile de temperatură, în schimb levuloza este puternic influenţată.

Un grad zaharimetric corespunde în g/l pentru diferite glucide în concentraţie 10%:

— 1,634 zaharoză;
— 2,065 glucoză;
— 1,07 levuloză;
— 1,36 galactoză;
— 0,78 maltoză;
— 1,92 lactoză;
— 0,57 dextrină de amidon.

Teste pentru diferenţierea zaharurilor

Mono- şi dizaharidele se condensează cu fenilhidrazina, dînd produşi numiţi osazone; reacţia se produce prin eliminarea unei molecule de apă între gruparea hidrazino şi o grupare aldehidică sau cetonică.

Testul Denigès. Diferenţiază glucoza de lactoză.

Reactiv Denigès: se dizolvă în 40 ml apă distilată, 4 g acetat de sodiu şi 0,6 g bisulfit de sodiu; după dizolvare se adaugă soluţiei obţinute 8 ml acid acetic glacial şi 2 ml fenilhidrazină. Reactivul se păstrează în sticle brune timp îndelungat.

Tehnica. Într-o eprubetă se măsoară 5 ml urină limpede deproteinizată şi 5 ml reactiv Denigès; se ţine 45 de minute pe baia de apă, apoi se agită şi se filtrează la cald.

Rezultate. Examinarea se face imediat după scoaterea eprubetei din baia de apă, apoi la 6 şi 12 ore după răcire. Osazona glucozei rămasă pe filtru are forma unor ace galbene dispuse în snopi sau radiar, cînd cantitatea depăşeşte 4 g/l. Pînă la 1 g glucoză, cristalele pot să apară la cald şi rămîn pe filtru. Dacă nu apare nici un precipitat se trece într-o eprubetă de centrifugă şi se lasă 12 ore într-un loc rece. Se centrifughează şi se examinează la microscop sedimentul. Cu această metodă se pune în evidenţă glucoza pînă la 0,10 g/l. În concentraţie inferioară de 1 g, acele glucosazonei nu mai apar în formă clasică, ci cu forme variate. P.T. = 200 — 205°. În filtrat, imediat după răcire în cazul că există lactoză, apare osazona respectivă sub formă de arici de mare. Lactosazona, spre deosebire de glucosazonă, are P.T. = 213 — 215° şi se dizolvă uşor în alcool metilic sau acetonă diluată în părţi egale cu apă distilată. Osazona fructozei este identică cu cea a glucozei. Maltoza dă cu fenilhidrazina la rece o maltozozonă caracteristică în formă de lame unite printr-una din extremităţi cu P.T. = 206°.

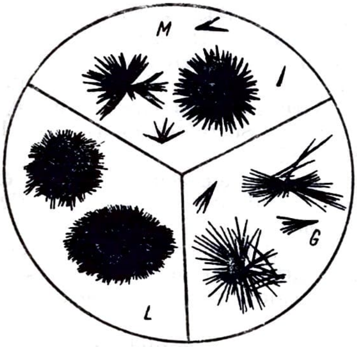


Fig. 79. — Cristale de oxazone: M — maltozazonă; L — lactozazonă; G — glucozazonă.

Testul pentru fructoză. Fructoza apare în urină mai rar singură, de obicei împreună cu glucoza. Deviază planul luminii polarizate la stînga. Dă aceleaşi teste de reducere ca şi glucoza. Osazona este identică cu cea a glucozei. Dă însă o reacţie caracteristică cu soluţia de rezorcină. 0,1g rezorcină în 3 ml HCl concentrat (D = 1,19).

Tehnica. La 3 ml urină se adaugă 1,5 ml rezorcină în acid clorhidric şi se fierbe 20 – 30 de secunde în baia de apă.

Rezultate. În prezenţa levulozei apare imediat o culoare roşie. Sensibilitatea metodei este de 0,5 g levuloză/litru.

Erori. Fierberea mai îndelungată dă reacţie nespecifică. Glucoza în cantitate mai mare de 2% dă o coloraţie brună: în acest caz se va dilua urina.

Testul pentru galactoză. Galactoza poate fi pusă în evidenţă prin transformarea ei în acid mucic.

Tehnica. Într-o capsulă se pun: 50 ml urină, 10 ml acid nitric. Se evaporă pînă la un volum de 10 ml.

Rezultate. Dacă galactoza este prezentă, lichidul devine clar cu un precipitat alb de acid mucic. În cazul cînd densitatea urinii este mai mare de 1 020 se adaugă o cantitate mai mare de acid nitric (10—20 ml) şi se evaporă pînă la volumul acidului utilizat.

Reacţia nu este specifică, ea este pozitivă şi în prezenţa lactozei.

Testul pentru diferenţierea lactozei de galactoză. Se face prin metoda Rubner: 1. acetat neutru de plumb 10%; 2. amoniac 25%.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 10 ml urină + 10 picături acetat neutru de plumb 10%. Amestecul se fierbe şi se filtrează. Filtratul se încălzeşte apoi cîteva minute, în care timp apare o culoare galbenă-maro. Se adaugă 1 ml amoniac 25% şi se continuă fierberea.

Rezultate. În prezenţa lactozei apar o coloraţie roşie-deschisă şi un precipitat roşu-intens. În prezenţa galactozei apar o coloraţie roză şi un precipitat galben.

Testul pentru pentoze. Pentoza apare în urină, fie singură, fie cu glucoza. Dacă glucoza este prezentă trebuie îndepărtată prin fermentaţie cu drojdie de bere. Pentoza nu este fermentată. Ea se pune în evidenţă cu reacţia Bial.

Reactiv: 0,1 g orceină dizolvată în 50 ml acid clorhidric 30 ‰, plus 2 picături clorură ferică 10%. Reactivul se păstrează în sticle de culoare închisă, bine astupate.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 5 ml reactiv şi se încălzeşte pînă la fierbere. Se adaugă picătură cu picătură 1 ml urină deproteinizată cu reactiv Courtonne.

În prezența pentozei apare o colorație verzuie. Fructoza, în aceleași condiții, dă un inel brun.

În urina normală se găsește în cantități minimale, 350–500 mg/24 de ore. Aceste cantități nu sînt puse în evidență prin metodele curente de lucru. În urinile patologice se pot găsi în cantități mari diferite glucide.

Este necesar a se face diferențierea tipului de glucid. Cel mai frecvent glucid prezent în urinile patologice este glucoza. Glicozuria poate fi permanentă sau tranzitorie. Acest lucru se constată prin analize repetate ale urinii pe nemîncate și după ingerarea de alimente. O glicozurie tranzitorie poate fi de origine alimentară, în timpul sarcinii, în hipertiroidism și în diferite intoxicații.

O glicozurie permanentă — diabetul — indică alterarea funcției endocrine pancreatice.

Fructoza se găsește în urină, de obicei împreună cu glucoza, în diabet sau în urma unor anomalii de metabolism. În cazul unor leziuni ale parenchimului hepatic, în diferite forme de icter, există o toleranță scăzută pentru levuloză (25–50 g), pe cînd la persoanele sănătoase toleranța este de 100 g.

Lactoza poate apărea în urina gravidelor sau în timpul lactației. De asemenea poate apărea la indivizii supuși unui regim lactat.

Pentoza, găsită de obicei în urina patologică, este arabinoza racemică care este reductoare. Ea apare în formele grave ale diabetului zaharat. Există și o pentozurie cronică, care nu are nimic comun cu diabetul. Pentoza poate fi găsită în urină și după administrarea unor medicamente (camfor, cloralhidrat etc.) sau după ingerarea unor fructe bogate în pentoze.

Testele dinamice de toleranță la glucide

Testul încărcării la glucoză per os. Proba se face cu 100 g glucoză *per os* (rezultatul este același chiar cu 20 sau 50 g glucoză), dată în ceai la 16 ore de la ultima masă. După 30 de minute, la normali glicemia crește, iar timp de 1 oră și jumătate — 2 ore, glicemia scade, revenind la valoarea inițială. La diabetici, hiperglicemia este mai pronunțată și mai îndelungată. Rezultatele sînt redate în figurile 80 și 81.

Glucoza poate fi administrată și intravenos în cantitate de 0,30 g/kilocorp. Se recoltează sînge înainte de injecție, precum și la 15, 30, 45 și 60 de minute după injecție. La normali, valoarea maximă este după 15 minute de la administrarea glucozei, apoi scade, pentru ca la 60 de minute să ajungă la valoarea inițială. La diabetici, valoarea maximă este tot după 15 minute însă hiperglicemia este mult mai mare, scade continuu pînă la 60 de minute, cînd întrece valoarea inițială. Rezultatele sînt redate în figurile 82 și 83.

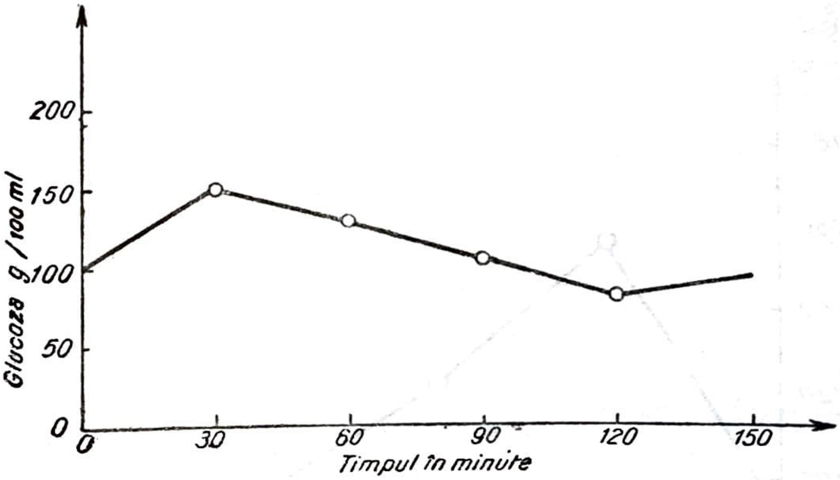


Fig. 80. — Curba glicemiei provocate la un om normal.

Proba de administrare repetată a glucozei prezintă un interes deosebit: la jumătate de oră după prima ingerare se administrează încă 50 g glucoză. În mod normal, această suplimentare nu provoacă o creștere a glicemiei, ci o ușoară scădere, pe cînd la diabetici ea provoacă o nouă urcare a glicemiei. Toleranța față de glucide este scăzută în diabet, acidoză, cașexie, hipertiroidism, boli infecțioase, boli acute ale ficatului, intoxicații, icter prin obstrucție, hiperpituitarism. Toleranța față de glucide este, dimpotrivă, crescută în boala Addison.

Proba cu adrenalină constă în injectarea cutanată a 1 mg adrenalină și urmărirea timp de 2 ore a glicemiei ca și a leucocitozei.

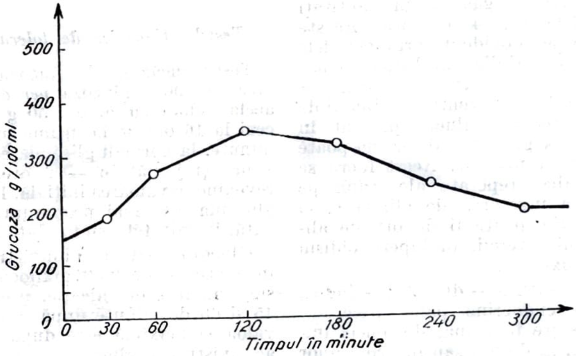


Fig. 81. — Curba glicemiei provocate la un bolnav cu diabet;

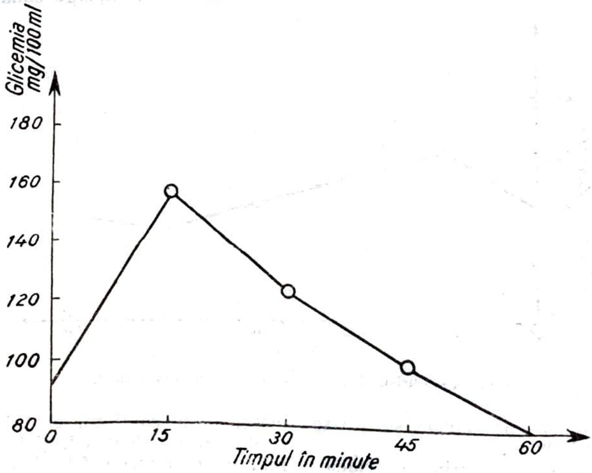


Fig. 82. — Curba glicemiei provocate la un om normal.

Tehnica. Bolnavul nu mănîncă şi stă la pat în timpul probei. Se determină glicemia şi leucocitoza, apoi se injectează subcutanat 1 mg adrenalină.

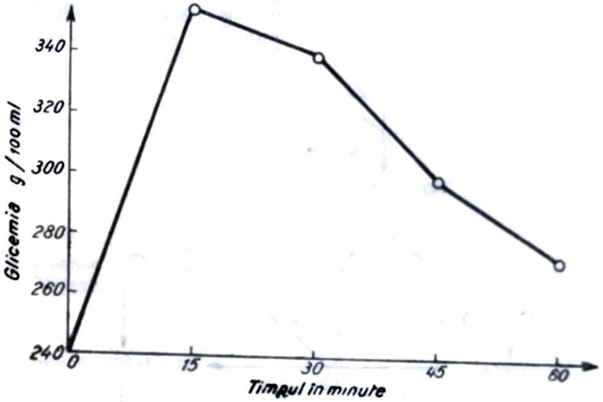


Fig. 83. — Curba glicemiei provocate la un diabetic.

Glicemia şi leucocitoza se determină după 15, 30, 45, 60, 90 şi 120 de minute din momentul injectării.

În mod normal, numărul leucocitelor creşte brusc în primele 45 de minute şi scade după aceea.

Glicemia creşte la 60 de minute, ajungînd la 140 — 190 mg%, scade apoi, revenind după 120 de minute la normal.

În cazuri patologice, curbele glicemiei şi leucocitozei prezintă modificări; curbele sînt mai mult linii drepte.

Testul toleranţei la insulină. Proba se bazează pe faptul că, după o injecţie de insulină, înainte de obişnuita scădere a glicemiei se observă o scurtă dar netă creştere a acesteia. În caz de insuficienţă hepatică, această hiperglicemie este redusă sau lipseşte complet.

Tehnica. Proba se efectuează dimineaţa pe nemîncate. Se determină glicemia, apoi se injectează intravenos 30 u. insulină pentru un bolnav de 60 kg. După 3, 8 şi 12 minute de la injecţie se determină din nou glicemia. La 15 minute după injecţie se administrează intravenos 25 ml dintr-o soluţie de glucoză 40% şi i se dă un prînz bogat în glucide.

Interpretare. În caz de funcţie hepatică normală se constată în general la 3 minute după administrarea intravenoasă a insulinei o creştere a glicemiei de 10 — 20 mg% peste valoarea glicemiei iniţiale, apoi urmează o scădere sub nivelul glicemiei iniţiale.

În leziunile parenchimului hepatic, hiperglicemia după 3 minute lipseşte.

Ficatul reprezintă organul major pentru conversiunea hexozelor neglucozice — fructoză şi galactoză în glucoză.

Fructoza, sub influenţa unei enzime specifice — fructokinaza — este fosforilată în fructoza-1-$\boxed{P}$, prin ATP (1). O izomerază hepatică transformă apoi fructoza-1-$\boxed{P}$ în fructoza-6-$\boxed{P}$ (2), care se degradează la piruvat pe calea clasică a glucozei (3).

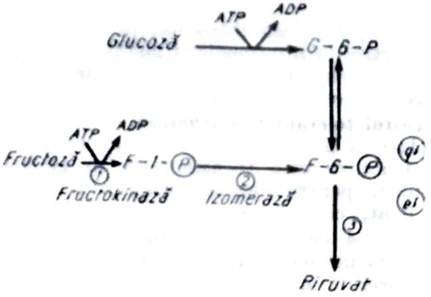


Fig. 84. — Metabolizarea fructozei în ficat.

Ficatul este capabil a scinda fructoza-1-$\boxed{P}$ direct în D - gliceroaldehidă şi dihidroxiacetonfosfat (1). Acesta se transformă în 3-$\boxed{P}$-gliceroaldehidă (2) şi acid 3-$\boxed{P}$-gliceric (3) intermediari din calea Embden-Meyerhoff. D-gliceroaldehida, sub influenţa unui DPN (difosfopiridin-nucleotid) specific pentru celula hepatică, trece în D-glicerat (4) şi apoi, prin fosforilare cu ATP, în acid-3-$\boxed{P}$-gliceric (5), care se degradează la piruvat.

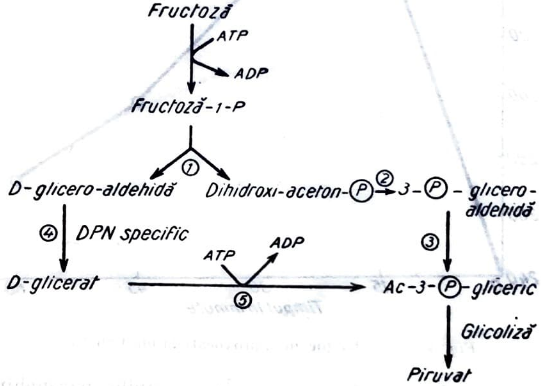


Fig. 86. — Metabolizarea fructozei în ficat.

Astfel, fructoza introdusă în organism este convertită la intermediarii metabolici ai glucozei şi metabolizată. Pe aceste fenomene se bazează testele de toleranţă la fructoză.

Testul toleranţei la fructoză. Principiul este acelaşi ca şi la galactoză, cu singura deosebire că fructoza este transformată în glucoză şi utilizată pentru sinteza glicogenului nu numai în ficat, ci şi în epiteliile intestinale.

Tehnica constă în administrarea a 100 g fructoză în 300 ml ceai şi urmărirea eliminării fructozei în urină în următoarele 12 ore, ca la proba cu galactoză. În fiecare porţiune de urină se determină fructoza prin reacţia Seliwanoff.

Determinarea. O parte din urină se amestecă cu o parte acid clorhidric 25%, care conţine cîteva granule de rezorcină. Amestecul se încălzeşte. În prezenţa fructozei apare de îndată o coloraţie roşie intensă şi se depune un precipitat roşu care se redizolvă după adăugarea de alcool.

În cazul cînd urina conţine pigmenţi biliari, ea trebuie decolorată în prealabil după formula următoare: 18 ml urină + 2 ml alcool 96° + 0,5 g cărbune animal; amestecul se agită puternic şi se filtrează.

Determinarea cantitativă se face prin metodele descrise la urină. În mod normal, fructozuria este absentă sau nu depăşeşte 0,7 g‰. O valoare mai mare indică existenţa unor alterări hepatice difuze; ciroza şi luesul hepatic dau rezultate variabile în raport cu cantitatea de parenchim rămasă în stare de funcţionare. Proba de levulozurie poate fi asociată în mod util cu o determinare a glicemiei în decursul probei. Pentru aceasta, înainte de administrarea levulozei şi apoi la intervale de 30 de minute, timp de 2 ore, se determină glicemia.

În mod normal, după administrarea fructozei, glicemia nu depăşeşte cu peste 30 mg% nivelul iniţial şi revine cu regularitate la normal în decurs de 2 ore şi jumătate. În afecţiunile parenchimului hepatic se constată o creştere mai netă, iar revenirea la normal este întîrziată.

Proba dă în multe cazuri rezultate neconcordante.

Galactoza intră în calea Embden-Meyerhoff (fig. 87), fosforilîndu-se cu ATP sub influenţa galactokinazei (reacţia 1) galactozo-1-P; sub influenţa UTP (uridintrifosfat) se transformă în uridin difosfat de galactoză (2). Acesta este oxidat în două trepte (3*a* şi *b*) de galacto-waldenază pînă la uridin-difosfatul de glucoză. O uridil transferază (4), specifică ţesutului hepatic, uneşte UDP-G-ul cu galactozo-1-P, formînd glucozo-1-P, care intră în calea Embden-Meyerhoff. UDP-galactoza reia apoi ciclul.

Menţionăm că UDP-G poate fi transformat la G-1-P şi de o UDPG-fosforilază nehepatică, ceea ce face ca specificitatea conversiunii galactozei în ficat să nu fie absolută.

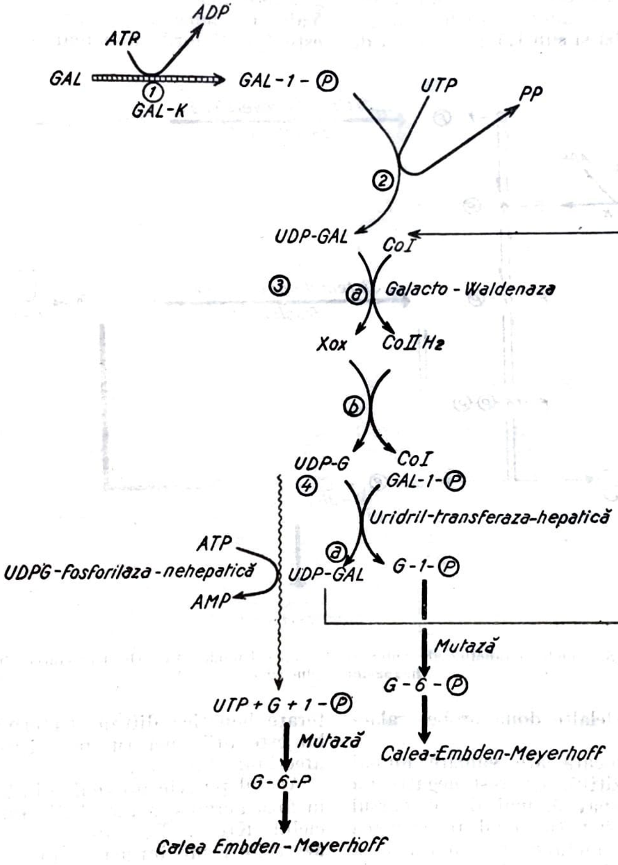

GAL
ATP
ADP
GAL-1-Ⓟ
①
GAL-K
UTP
PP
②
UDP-GAL
CoI
③
ⓐ
Galacto-Waldenaza
Xox
CoII H2
ⓑ
UDP-G
CoI
④
GAL-1-Ⓟ
Uridril-transferaza-hepatică
ATP
UDPG-fosforilaza-nehepatică
AMP
ⓐ
UDP-GAL
G-1-Ⓟ
Mutază
G-6-Ⓟ
Calea-Embden-Meyerhoff
UTP + G + 1-Ⓟ
Mutază
G-6-P
Calea Embden-Meyerhoff

Fig. 86. — Conversiunea galactozei în ficat.

Dăm schematic, în figura 87, sistemele metabolice ale conexării la calea Embden-Meyerhoff, în conversiunea hexozelor neglucozice.

Testul toleranţei la galactoză. Galactoza fiind transformată numai de ficat în glucoză, existenţa unei leziuni hepatice se traduce prin creşterea cantităţii de galactoză în urină.

Tehnica. Bolnavul primeşte în ajun seara un regim lipsit de glucide. La ora 8 dimineaţa, după ce a urinat, i se dă să bea 300 ml ceai cu 40 g galactoză. Se recoltează urina în vase curate la 2, 4, 10 şi 24 de ore după ingerarea glucozei. Bolnavul rămîne culcat şi nu i se dă mîncare în timpul probei. În urinile colectate se determină cantitatea de galactoză prin metoda Fehling sau Benedict. Se face o simplă determinare cantitativă cu soluţie Fehling şi în urina recoltată înainte de administrarea galactozei. Normal se elimină sub 6 $\text{g}^0/_{00}$ galactoză în prima probă şi sub 1,5 $\text{g}^0/_{00}$ în cea de a doua probă; în celelalte două probe, galactoza este absentă.

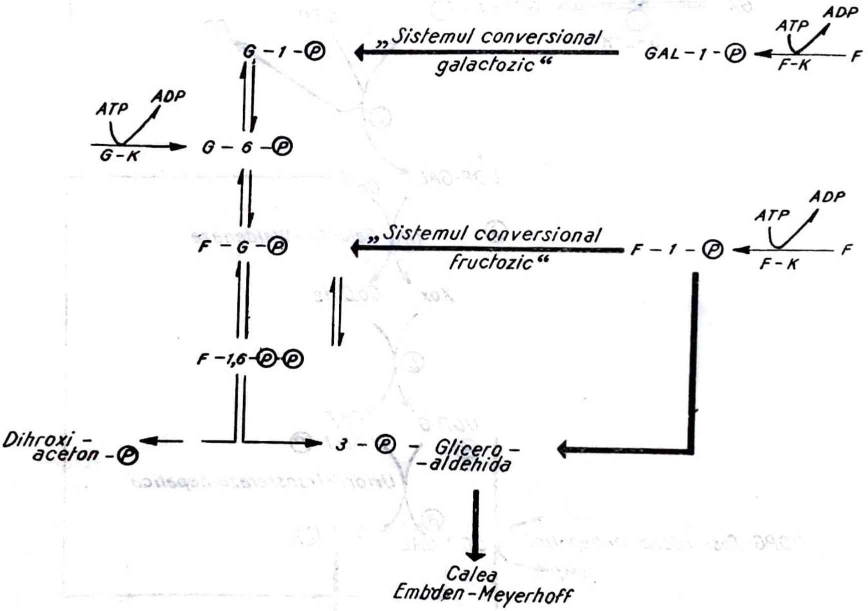


Fig. 87. — Sistemele metabolice ale conexării la calea Embden-Meyerhoff în conversiunea hexozelor neglucozice.

Galactozuria provocată are valoare numai cînd reacţia este pozitivă. Un test negativ nu exclude o alterare hepatică, mai ales în cursul evoluţiei unui icter hepatic, cînd regenerarea hepatică permite o metabolizare normală a galactozei. În hepatita acută, concentraţia galactozei variază între 30 şi 70 $\text{g}^0/_{00}$ în prima probă şi între 15 şi 20 $\text{g}^0/_{00}$ în cea de a doua, iar în ultimele două probe glucoza este absentă. Afecţiuni hepatice difuze, hepatite, atrofia galbenă acută, leziuni parenchimatoase toxice, ca şi cirozele şi luesul hepatic determină un rezultat pozitiv al probei.

În urma rezultatelor obţinute cu testul toleranţei la galactoză s-a căutat o perfecţionare a probei şi anume determinarea concomitentă a glicemiei şi stabilirea unui indice glicemic. Indicele glicemic este raportul dintre glicemia maximă din cursul probei şi valoarea glicemiei înainte de administrarea de galactoză. Valoarea normală maximă a acestui raport este 1,5. Valorile mai mari de 1,8 indică o alterare hepatică difuză. Determinarea raportului este utilă pentru urmărirea evoluţiei unei afecţiuni hepatice.

Acidul piruvic provenit din glicoliză este ars în faza aerobă a metabolismului glucidic prin ciclul Krebs. El suferă o decarboxilare la acetil-CoA sub influenţa unui complex catalitic numit LTPP (lipotiaminpirofosfat şi CoA) (1). Acetil-CoA prin condensare cu oxalacetatul iniţiază ciclul (2). Piruvatul poate fi şi el redus la acid lactic prin DPN (difosfopiridinnucleotid). În ficat, această reacţie este reversibilă (3), lactatul adus aici din circulaţie din alte regiuni ale organismului fiind transformat în piruvat şi metabolizat.

Tot în ficat, din acetil-CoA se pot face sinteze de acizi graşi (4) şi de oxalacetat, prin cuplarea CO_2 cu acidul piruvic (reacţia Wood-Werkmann) (5).

Aceste reacţii metabolice reprezintă baza teoretică pentru testul lactatului şi piruvatului. Urmărindu-se metabolizarea şi dispariţia lor se poate face o apreciere asupra eficienţei funcţionale hepatice.

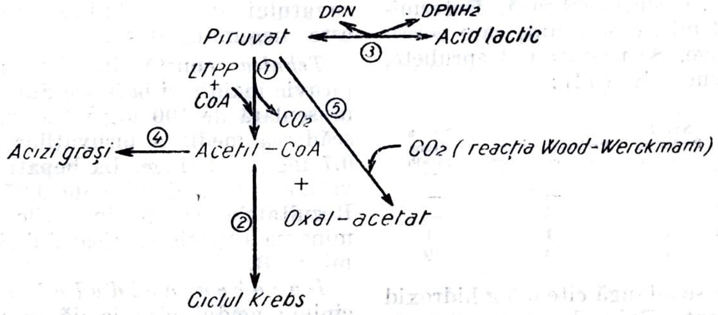


Fig. 88. — Metabolismul acidului piruvic în ficat.

Testul toleranţei la acid lactic. În mod normal, acidul lactic este folosit la nivelul ficatului pentru sinteza de glicogen. Proba toleranţei la acid lactic se bazează pe scăderea capacităţii ficatului de a transforma acidul lactic în glucoză, în cursul afecţiunilor hepatice.

Tehnica. Dimineaţa pe nemîncate se injectează intravenos 75 mg lactat de sodiu/kilocorp în soluţie de 10%, după ce s-au recoltat 10 ml sînge fără stază venoasă. După 30 de minute de la injectarea lactatului de sodiu se recoltează din nou 10 ml sînge.

În proba martor şi proba de cercetat se determină acidul lactic.

Metoda colorimetrică. Acidul lactic în prezenţa veratrolului în mediu acid dă o coloraţie roşie, a cărei intensitate este proporţională cu cantitatea de acid lactic.

Reactivi :

1. Acid metafosforic 5%.
2. Soluţie saturată de sulfat de cupru.
3. Oxid de calciu.
4. Acid sulfuric concentrat.
5. Veratrol soluţie 0,125 g în 99,8 ml alcool absolut.

Tehnica. Bolnavul stă în repaus o oră înainte de recoltare. 5 ml sînge venos recoltat pe oxalat de sodiu este centrifugat timp de 10 minute. Din plasma separată se ia 1 ml şi se diluează cu 6 ml apă distilată. Se agită şi se lasă să cadă picătură cu picătură 1 ml acid metafosforic 5%, agitînd uşor. După cîteva minute se filtrează.

Din filtrat se ia 0,5 ml lichid şi se pun într-o eprubetă, apoi se adaugă picătură cu picătură 3 ml acid sulfuric, răcind amestecul. Eprubeta este ţinută 4 minute într-o baie de apă la fierbere, apoi este răcită imediat în apă cu gheaţă şi se adaugă 0,1 ml soluţie de veratrol. După 20 de minute, proba se citeşte la fotometrul Pulfrich cu filtru verde S_{530} m μ şi cuva de 10 mm. Curba etalon este obţinută din diluţiile efectuate din soluţia standard obţinută din lactat de litiu (uscat pînă la greutate constantă); diluţiile sînt tratate cu veratrol ca şi proba.

O creştere de peste 5 mg% faţă de cifrele normale are o semnificaţie patologică. Proba dă rezultate apreciabile chiar şi în eventualitatea unor leziuni uşoare ale parenchimului hepatic.

Metoda spectrofotometrică pentru determinarea acidului lactic se bazează pe oxidarea acidului lactic în acetaldehidă, care poate fi determinată colorimetric prin reacţia cu p-hidroxi-difenil în prezenţa ionilor de cupru.

Reactivi : 1. Sulfat de cupru 20%.
2. Hidroxid de calciu pulbere.
3. Reactiv p-hidroxidifenil.
4. Soluţie acid lactic 0,2 mg/ml.
5. Acid tricloracetic 10%.

1,5 g p-hidroxidifenil se dizolvă în 10 ml hidroxid de sodiu 5% şi apoi se completează cu apă distilată la 100 ml. Reactivul se păstrează luni de zile în flacoane de culoare brună, bine închise.

Soluția de acid lactic 0,2 mg/ml se prepară din 0,213 g lactat de litiu uscat, dizolvate în apă distilată într-un balon cotat de 100 ml. Înainte de a se aduce la semn se adaugă 1 ml acid sulfuric concentrat. Soluția de acid lactic 0,2 mg/ml se conservă la +4°, timp nelimitat. Soluția de lucru, care se prepară în momentul întrebuințării, este de 0,01 mg/ml.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 1 ml sînge + 4 ml acid tricloracetic 10%. Se agită și se centrifughează. Determinarea se face pe 2 ml supernatant, care corespund la 0,2 ml sînge. Se pregătesc 3 eprubete, în care se pun succesiv (ml):

	Nr. 1 Proba de cercetat	Nr. 2 Proba cu concentrația cunoscută	Nr. 3 Proba în alb
Supernatant	2	—	—
Acid lactic 0,01 mg/ml	—	5	—
Sulfat de cupru 20%cm	1	1	1
Apă distilată	7	4	9

În toate tuburile se adaugă cîte 0,5 g hidroxid de calciu pulverizat. Tuburile sînt astupate perfect, se agită pînă la omogenizare completă. Se lasă în repaus 1/2 oră și apoi se centrifughează. La 1 ml supernatant se adaugă 0,05 ml soluție sulfat de cupru 4% (pregătit în momentul efectuării analizei, din soluția 20%) și foarte încet 6 ml acid sulfuric concentrat. Pentru 5 minute, eprubetele sînt ținute în apă fierbinte, apoi se răcesc și se adaugă încet 0,1 ml reactiv hidroxidifenil în fiecare eprubetă. Se agită eprubetele pentru dispariția precipitatului, se țin 30 de minute la 30°. Probele astfel pregătite se fierb 90 de secunde. După răcire se determină absorbția la 560 mμ. Se reglează aparatul cu proba în alb.

Calcul: mg acid lactic % ml sînge =

$$= \frac{\text{absorbția probei de cercetat}}{\text{absorbția probei cunoscute}} \times 0{,}005 \times 50 \times 100.$$

Valori normale = 5 — 20 mg acid lactic % ml sînge.

După efort fizic, la oameni sănătoși, conținutul de acid lactic ajunge la 100 mg și chiar peste, dar scade foarte repede în stare de repaus. Valori crescute de acid lactic apar în general atunci cînd țesutul nu este suficient aprovizionat cu oxigen, ca în pneumonie, insuficiență cardiacă sau în cazul în care organismul nu este în situația de a menține echilibrul între producția de acid lactic și consumarea lui, cum se întîmplă după narcoze, intoxicații, în bolile ficatului și în toate bolile însoțite de dispnee. O cantitate mare de acid lactic în sînge are ca urmare reducerea corespunzătoare a cantității de bicarbonat în sînge, deci o acidoză. Ea dispare îndată ce cantitatea de acid lactic a scăzut.

Testul toleranței la acid piruvic. Proba cu acid piruvic se bazează pe creșterea piruvatului în sînge, în cursul insuficienței hepatice. După administrarea de 100 mg vitamină B_1, în mod normal piruvatul scade în sînge. În cazul unei insuficiențe hepatice, reducerea piruvatului după administrarea vitaminei B_1 este nesemnificativă.

Tehnica constă în determinarea acidului piruvic înainte și la 3 ore după o injecție intramusculară de 100 mg vitamină B_1. La normali scăderea medie a piruvaților în sînge este de 0,7 mg% ml sînge. La hepatici, scăderea piruvaților este mai mică de 0,07 mg% ml sînge. Rezultatele probei sînt utile și pentru determinarea capacității ficatului de a utiliza vitamină B_1.

Dozarea acidului piruvic. Principiul: acidul piruvic dă în mediu alcalin cu 2-4-dinitrofenilhidrazina un compus colorat, a cărei intensitate este proporțională cu cantitatea de acid piruvic.

Reactivi:

1. Acid tricloracetic soluție 20%.
2. Soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină 0,1% în HCl 2 N.
3. Toluen p.a. sau chimic pur.
4. Carbonat de sodiu soluție 10%.
5. Hidroxid de sodiu soluție 2 N.
6. Monoiodacetat de sodiu 10%.

Tehnica. Se recoltează 5 ml sînge pe 20 mg oxalat de potasiu. Se agită bine și se execută analiza imediat. (Este bine ca la recoltare să se adauge 0,1 ml soluție de monoiodacetat de sodiu.) Se iau 4 ml sînge și 4 ml acid tricloracetic 20%. Se agită și se lasă în repaus 20 — 30 de minute. Se filtrează prin hîrtie cantitativă sau se centrifughează.

Din filtratul clar se iau 3 ml la care se adaugă 1 ml dinitrofenilhidrazină 0,1%. Se lasă să stea 6 minute, apoi se trece lichidul într-o pîlnie de separare (tip Grigaut), la care se adaugă 4 ml toluen. Se agită bine, se lasă în repaus pînă se separă distinct două straturi. Stratul inferior se trece în eprubeta inițială, iar stratul de toluen se transvazează într-o altă eprubetă, pe la partea superioară a pîlniei de separare. Se repetă în aceleași condiții extracția cu 4 ml toluen și o ultimă extracție cu 2 ml toluen. Toluenul de la cele 3 extracții este reunit. Se spală pîlnia de separare, apoi se trece în ea extractul toluenic. La extractul toluenic se adaugă 2 ml soluție carbonat de sodiu 10%, se agită și se lasă în repaus pînă la separarea celor două straturi. Stratul inferior apos se trece într-o eprubetă. Se repetă extracția cu încă 2 ml soluție carbonat de sodiu 10%.

Se reunesc soluțiile extrase de carbonat de sodiu, peste care se adaugă 4 ml hidroxid de sodiu 2 N. Se agită, se lasă în repaus 10 minute. Se fotometrează apoi cu filtrul S_{530} în cuva de 2 ml martor apă distilată. Factor de pantă =1,85 mg acid piruvic % ml = $E \times F$.

Valori normale = 0,5 — 1,2 mg acid piruvic la 100 ml sînge.

ROLUL FICATULUI ÎN METABOLISMUL LIPIDIC

Ficatul îndeplinește în metabolismul lipidic următoarele funcții:

A. Este unul dintre organele importante pentru degradarea și sinteza acizilor grași și unul din polii axei „ficat-depozite", axă care reglează balanța fiziologică lipidică.

B. Este locul unde se formează corpii cetonici (funcția de cetogeneză).

C. Este organul major de sinteză și dirijare metabolică a lipidelor complexe (fosfolipidele).

D. Este locul cel mai important unde se sintetizează colesterolul și, probabil, reprezintă unica sursă de acizi biliari ai organismului.

FICATUL ȘI METABOLISMUL ACIZILOR GRAȘI

La nivelul celulei hepatice se fac degradarea și sinteza acizilor grași, deși astăzi se știe că acest proces nu mai este strict specific, cum se credea, ci are loc și în alte țesuturi.

Într-o primă fază, acidul gras este „activat" cu ajutorul ATP și al coenzimei A, rezultînd un acil-CoA (reacția 1). Acesta este apoi supus unor transformări cunoscute sub numele de „ciclul Lynen", fiind transformat succesiv într-un acil-nesaturat, prin intermediul flavin-adenindinucleotidului (FAD), care îi ia 2 H (reacția 2), într-un oxiacil, prin intermediul apei (reacția 3), într-un cetoacil, prin intermediul difosfopiridinnucleotidului (DPN), care îi ia alți 2 H (reacția 4) și, în sfîrșit, scindat prin intermediul unei noi molecule de coenzimă A într-un acil-CoA cu 2 atomi de C mai puțin și într-o moleculă de acetil-CoA.

O desfășurare a ciclului va scurta acidul gras cu 2 C. Sinteza acizilor grași nu se mai face prin inversarea reacțiilor din ciclul Lynen, cum a fost considerat un timp. S-a demonstrat că sinteza nu se face prin cuplarea moleculelor de acetil, două cîte două, ci prin utilizarea fragmentului C_1 — printr-o reacție de carboxilare, care are drept cofactor biotina. Etapele metabolice sînt următoarele:

$CO_2 + ATP + \text{biotin-enzimă} \rightarrow CO_2 \sim \text{biotin-enzimă} + C_1 + ADP$

$CO_2 \sim \text{biotin-enzimă} + \text{acceptor} \rightarrow HOOC-\text{acceptor} + \text{biotin-enzimă}$.

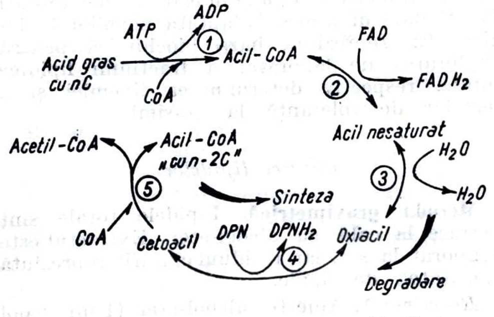


Fig. 89. — Metabolismul acizilor grași în ficat.

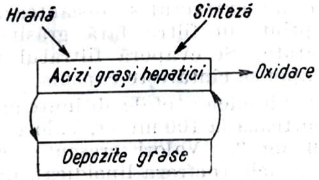


Fig. 90. — Balanța lipidică „ficat-depozite".

Prima treaptă metabolică o reprezintă condensarea cu acetil-CoA, sub influența unei acetil-CoA-carboxilaze:

$$CO_2 + \text{acetil-CoA} + ATP \xrightarrow[\text{acetil-CoA-carboxilaza}]{Mn^{++}} \text{malonil-CoA}$$

Malonil-coenzima A joacă un rol important în sinteza ulterioară, ea combinîndu-se cu un alt fragment de acetil-CoA, avînd drept cofactor TPNH, după schema:

$$\text{malonil-CoA} + \text{acetil-CoA} \xrightarrow[\text{TPN.H} \frown \text{TPN}]{} \text{butiril-CoA}$$

Ficatul este organul care dirijează circuitul acizilor grași, obținuți prin sinteză sau aduși cu hrana. El îi arde sau îi îndreaptă spre depozitele grase, în mod reversibil, după cum cer nevoile momentului.

Reglarea armonioasă a acestei balanțe menține metabolismul lipidic în cadrul unei unități funcționale dinamice, adaptată nevoilor biologice. Ea reprezintă baza biochimică pentru explorarea de laborator a fracțiunii lipidice totale, respectiv determinarea lipemiei și a testelor de toleranță la grăsimi.

Dozarea lipidelor

Metoda gravimetrică. Lipidele totale sînt extrase la cald cu alcool-eter. Extractul este evaporat la sec, iar reziduul cîntărit reprezintă cantitatea de lipide.

Reactivi : 1. Amestec alcool-eter (1 ml alcool 96°+3 ml eter).

2. Cloroform.

Tehnica. 1 ml ser se pune cu pipeta cît mai uniform pe o bucată de hîrtie de filtru cantitativ. Hîrtia se usucă și apoi se așază în aparatul Soxhlet direct în extractor. Se lasă pe baia de nisip 2 ore la 60° și exctractul alcool-eter din balonul aparatului Soxhlet se trece într-o capsulă și se evaporă complet. Reziduul se ia cu eter, iar extractul se decantează sau se filtrează printr-un filtru fără grăsime într-o capsulă tarată. Se evaporă filtratul în etuvă la 105° și apoi se cîntărește capsula.

Cantitatea lipidelor totale obținute prin cîntărire se raportează la 100 ml ser. Valori normale : 500 — 750 mg %. Valori crescute se găsesc în boli de rinichi (nefroza lipoidică), în anemii, diabet și hipetiroidism. Valori crescute se găsesc în mod fiziologic după mese bogate în grăsimi.

Acizii grași sînt reprezentați prin diferența dintre lipidele totale și colesterol.

Dozarea colesterolului poate fi executată chiar din reziduul reluat în cloroform pentru dozarea lipidelor totale. În acest scop, reziduul se reia în 10 ml cloroform. 5 ml servesc la dozarea lipidelor totale, iar 5 ml servesc la dozarea colesterolului cu metoda Grigaut.

Micrometodă pentru dozarea lipemiei. Principiul constă în colorarea lipidelor serice cu Sudan negru B sau Sudan III și apoi fotometrarea soluțiilor colorate.

Reactivi :

1. Soluția saturată de Sudan III. Într-un balon cu refrigerent se dizolvă în 500 ml la fierbere 1—2 g Sudan III într-un amestec 9 :1 de alcool etilic 75% și acetonă ; se răcește și se filtrează. Colorantul se conservă în sticle de culoare brună, bine închise. Soluția saturată de Sudan III poate fi înlocuită cu soluția saturată de Sudan negru preparată în aceleași condiții.

2. Soluția de eluare : se face un amestec 80 ml metanol + 10 ml acid acetic glacial + 10 ml HCl 6N.

3. Soluție de trioleină 1% în alcool absolut (soluție standard).

Tehnica. Se ia cu o micropipetă 0,03 — 0,06 ml ser nehemolizat, care se pune în centrul unei mici bucăți de hîrtie de filtru. După uscarea petei, hîrtia se introduce într-o placă Petri, care conține soluția Sudan III și în care se lasă timp de 6 ore. Se scoate apoi și se spală într-un alt vas de mai multe ori cu amestec alcool, 50% pînă cînd devine albă în regiunile unde nu există lipide. După uscare la temperatura camerei, se decupează de pe ea petele de culoare galbenă-portocalie și se taie în fîșii de aproximativ 2—3 mm, care se pun într-un cilindru gradat de 10 ml, unde se eluează 30 minute cu 3—6 ml dintr-un amestec format din metanol acid acetic glacial — acid clorhidric 6N (8 :1 :1), agitînd din timp în timp. După eluare se fotometrează cu un filtru de 550 mμ. În condiții identice se execută și o probă cu trioleină 1%, la care se raportează proba de cercetat.

Calcul : lipide totale mg% $= \frac{1\,000}{E_1} \times E_2$,

unde :

E_1 = extincția probei martor ;
E_2 = extincția probei de cercetat.

FICATUL ȘI CETOGENEZA

La nivelul ficatului, 2 molecule de acetil-CoA, rezultate din degradarea acizilor grași, se condensează, eliminînd o moleculă de CoA și formează aceto-acetil-CoA (reacția 1). O nouă eliminare de CoA (reacția 2) formează acidul acetil-acetic, capul de serie al corpilor cetonici. Acesta se poate reduce cu ajutorul difosfopiridinnucleotidului redus (DPN), formînd acidul β-hidroxibutiric (reacția 3) — al doilea corp cetonic — sau se poate decarboxila (reacția 4) formînd acetona — al treilea corp cetonic.

Corpii cetonici fiind foarte toxici sînt arşi de organism în ţesuturile extrahepatice (cetoliza). În mod normal, o mică parte a lor (reprezentînd fracţiunea nearsă) este eliminată prin intermediul sîngelui, la nivelul plămînului (acetona) şi a urinii. Aceste fenomene reprezintă baza biochimică pentru explorarea lor de laborator, respectiv determinarea corpilor cetonici în sînge şi urină.

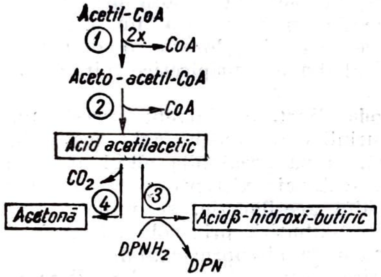


Fig. 91. — Mecanismul de formare a corpilor cetonici.

DETERMINAREA CORPILOR CETONICI ÎN URINĂ

Metoda Legal pune în evidenţă acidul acetil-acetic şi acetona.

Reactivi : 1. Nitroprusiat de sodiu 10% ; 10 g nitroprusiat de sodiu se dizolvă în 100 ml apă distilată.

2. Acid acetic 99%.

3. Hidrat de sodiu 40%.

Tehnica. Într-o eprubetă se măsoară 5 ml urină + 1 ml nitroprusiat de sodiu + 2 ml hidrat de sodiu. Se agită amestecul, se adaugă 2 ml acid acetic glacial. Imediat în prezenţa acetonei apare culoarea roşie. Culoarea verde indică lipsa acetonei şi prezenţa indicanului.

Metoda Legal modificată. *Reactivi* : 1. Nitroprusiat de sodiu 0,5 g dizolvate în 10 ml acid acetic p.a. 10%.

2. Amoniac 25%.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 5 ml urină deproteinizată sau filtrată, plus 1 ml nitroprusiat de sodiu. Se agită uşor, apoi se înclină eprubeta şi se adaugă cu grijă 1—2 ml amoniac ca să formeze un strat deasupra conţinutului eprubetei. Aprecierea rezultatelor se face după 5 minute. Cînd reacţia este pozitivă, la limita de separare apare un inel purpuriu violaceu. Intensitatea culorii variază în raport cu concentraţia corpilor cetonici. Dozarea se face prin diluarea urinii. Sensibilitatea reacţiei cu nitroprusiat de sodiu este de 40—80 mg acetonă la 1 000 ml urină şi de 8—16 mg acid acetil-acetic exprimat în acetonă la 1 000 ml urină. Culori asemănătoare dau uraţii amorfi, creatinina şi medicamentele care conţin aloe sau fenolftaleină.

Metoda Rothera. Soluţia de nitroprusiat fiind alterabilă, se utilizează o pudră care conţine 1 g nitroprusiat de sodiu, 200 g carbonat de sodiu anhidru şi 200 g sulfat de amoniu anhidru. Reactivul-praf se păstrează timp îndelungat.

Tehnica. Într-un godeu sau pe o lamă de sticlă se pune un vîrf de cuţit din reactiv şi se adaugă urina de cercetat pînă se formează o pastă.

Rezultate. Cînd reacţia este pozitivă, amestecul se colorează în violet, iar intensitatea culorii este proporţională cu concentraţia corpilor cetonici.

Metoda Frommer. Aldehida salicilică dă cu acetona, în mediu alcalin, o reacţie de condensare cu formare de dioxiortobenzol-acetonă de culoare roşie.

Reactivi : 1. Aldehidă salicilică 10 g în etanol 95° la 100 ml.

2. Hidroxid de potasiu p.a. 63,6 g%.

3. Soluţie standard de acetonă 1‰ în apă distilată. Se păstrează 2 săptămîni. La întrebuinţare se diluează 1/20 cu apă distilată.

4. Acid sulfuric concentrat p.a.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 10 ml urină filtrată + 3 ml hidroxid de potasiu şi 10 picături de soluţie de aldehidă salicilică. Se amestecă şi se încălzeşte 5—10 minute la 70° numai porţiunea superioară a eprubetei.

Rezultate. În prezenţa acetonei, în porţiunea încălzită apare o coloraţie portocalie pînă la roşie. Culoarea galbenă-maro indică o reacţie negativă.

Metoda Urbach. Principiu şi reactivi ca la metoda Frommer. Cînd testul calitativ pentru acetonă este pozitiv se face dozarea cu urină distilată.

Tehnica. Într-un aparat de distilat de un litru, fără garnituri de cauciuc, se pun 20—100 ml urină, plus apă pînă la 400 ml. Cantitatea de urină este luată în raport cu cantitatea de acetonă apreciată prin proba calitativă. Se adaugă apoi 5 ml acid sulfuric și se distilează circa 30 de minute. Lichidul de condensare se culege într-un balon care conține 25 ml apă distilată ; tubul colector al refrigerentului trebuie să pătrundă în interiorul vasului cu apă.

Din acest distilat se iau 2 ml peste care se adaugă 2 ml soluție de hidroxid de potasiu și 1 ml din soluția de aldehidă salicilică (proba de cercetat). Paralel se pregătește proba martor care conține o soluție cu 0,05 mg acetonă/ml în locul urinii distilate. Reactivii și operațiile sînt identice cu cele pentru proba de cercetat. Ambele probe se țin pe baia de apă la 50°, timp de 20 de minute. Se adaugă 10 ml apă în fiecare eprubetă și se trec în baloane cotate de 25 ml. Se completează pînă la semn cu apă distilată și se colorimetrează imediat sau cel mai tîrziu la 30 de minute de la adăugarea aldehidei salicilice.

Calcul :

$$\frac{Ie \times 0{,}10 \times 100}{Ip \times N} = \text{mg acetonă \%, unde :}$$

Ie = înălțimea soluției-etalon de acetonă ;
Ip = înălțimea probei de dozat ;
0,10 = cantitatea de substanță conținută în 2 ml soluție-etalon ;
N = cantitatea de urină corespunzătoare la cei 2 ml de urină distilată.

Metoda Gerhard. Acidul acetil-acetic tratat cu o soluție de clorură ferică dă un compus de culoare roșie-bordeaux sau violetă. Proba se face numai cu urină proaspătă. Prin încălzire moderată, acidul acetil-acetic se transformă în acetonă. Testul Gerhard este mai puțin sensibil decît cel cu nitroprusiat, testul fiind pozitiv la o cantitate mai mare de 0,5 g acid acetil-acetic/litru.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 5 ml urină proaspătă și se adaugă clorură ferică 10% pînă la dispariția precipitatului de fosfat feric format. Se face un martor adăugînd aceeași cantitate de clorură ferică 10% la 5 ml apă distilată.

Dacă apare o colorație roșie-bordeaux, ea poate fi datorită fie acidului acetil-acetic, fie unor medicamente. Verificarea reacției se face în modul următor : se fierb 10 ml de urină cu 10 ml de apă distilată pînă la reducerea volumului la jumătate ; se filtrează după răcire și se repetă proba de mai sus. Dacă de data aceasta nu mai apare colorația roșie-bordeaux înseamnă că ea a fost datorită prima oară acidului acetil-acetic care, ulterior, s-a transformat prin fierbere în acetonă.

Rezultate. În cazul cînd apare o colorație roșie-vișinie, aceasta denotă prezența acidului acetilacetic, însă reacția nu este specifică, deoarece aceeași colorație o dau și fenolii, salicilatul și unele antipiretice (piramidon, aspirină).

Metoda Hart. Se întrebuințează numai în cazul urinii care conține acid acetilacetic sau acetonă. După prealabila eliminare prin fierbere a acetonei existente și a celei rezultate din acidul acetilacetic, se pune în evidență acidul β -oxibutiric prin colorația roșie-violetă, pe care o dă cu nitroprusiatul de Na.

Tehnica. Într-un balon Erlenmeyer se pun : 20 ml urină, 20 ml apă distilată și 3—4 picături acid acetic 10% și se fierb pînă la un volum final de 20 ml, care se repartizează în două eprubete A și B ; în eprubeta A se adaugă 1 ml H_2O_2, iar în eprubeta B 1 ml ser fiziologic și se încălzesc ambele eprubete un minut la 60°. După răcire se adaugă în fiecare eprubetă 10 picături de acid acetic glacial + 10 picături soluție proaspătă de nitroprusiat de sodiu, 1—2 ml amoniac 20% și se amestecă bine.

Rezultate. În prezența acidului β-oxibutiric în eprubeta A, la care s-a adăugat apă oxigenată, va apărea un inel violaceu purpuriu, pe cînd în eprubeta B soluția rămîne incoloră (reacție pozitivă).

Corpii cetonici apar frecvent în urină la copii ; ei sînt de asemenea prezenți în diabet, în stările infecțioase, în dezechilibrul hidromineral, în toxicoza gravidică. Cantitatea cea mai mare apare în coma diabetică. Apariția de corpi cetonici duce la o modificare a rezervei alcaline și chiar a pH-ului, în sensul unei acidoze. În diabet, apariția acetonuriei precede apariția accidentelor comatoase.

FICATUL ȘI METABOLISMUL LIPIDELOR COMPLEXE

Ficatul este organul major pentru sinteza fosfolipidelor, compuși formați din glicerol, acid fosforic, acid gras și o bază azotată : colina sau colamina. Procesul comportă o primă activare a glicerolului prin ATP, cu formare de glicerofosfat (reacția 1). La aceasta se cuplează două molecule de acizi grași activați (respectiv acetil-CoA) care își elimină moleculele de coenzima A şi formează acidul difosfatidic (reacţia 2). Prin eliminarea acidului fosforic (reacţia 3) se formează digliceridul. Acesta se va uni cu baza azotată care, în prealabil, va fi şi ea activată prin CTP (citidintrifosfat), rezultînd citidin-difosfat-colina (CDP) — cu eliminarea unei molecule de fosfor (reacţia 4). O transferază va muta colina şi o moleculă de fosfor de pe CDP pe diglicerid (reacţia 5) rezultînd un fosfolipid şi CMP (citidin-monofosfat) care este apoi refăcut la CTP cu ATP (reacţia 6).

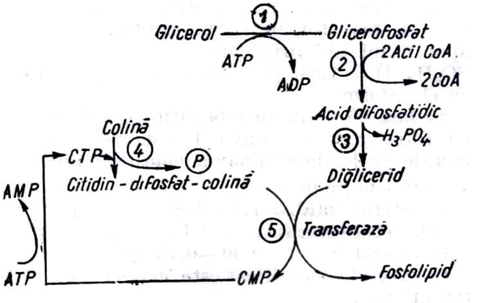

①
Glicerol
Glicerofosfat
ATP
ADP
②
2Acil CoA
2CoA
Acid difosfatidic
③
H_3PO_4
Diglicerid
Colină
④
CTP
Ⓟ
Citidin - difosfat - colină
AMP
ATP
CMP
⑤
Transferază
Fosfolipid

Fig. 92. — Formarea fosfolipidelor în ficat.

Ficatul menţine un echilibru între sinteza locală de fosfolipide şi între aportul de la nivelul intestinului şi plasmă. De asemenea, el este unul din organele în care se formează complexele lipidice cu proteinele, aşa-numitele „cenapse", în special cu fracţiunile α- şi β-globulinice.

Aceste fenomene reprezintă baza biochimică a explorării de laborator, respectiv a determinărilor de fosfolipide şi de cenapse (lipidograma).

FICATUL ŞI METABOLISMUL COLESTEROLULUI

Se ştie azi că sinteza colesterolului are loc şi în afară de ficat (de exemplu, peretele intestinal, muşchiul, glandele endocrine). Ţesutul hepatic joacă însă un rol fundamental în esterificarea sa şi în menţinerea unui echilibru dinamic continuu, cu plasma.

Biosinteza porneşte de la fragmentul dicarbonic acetil furnizat de „cazanul metabolic" glucidic şi lipidic, activat în prealabil prin coenzima A. Condensarea a 2 molecule de acetil-CoA va duce la acetoacetil-CoA (reacţia 1). Acesta este în echilibru cu β -hidroxi- β-metil-glutaratul (β-HMG) (reacţia 2), intermediar important legat de acidul glutamic şi de „cazanul metabolic" proteic. Pe de altă parte, acetoacetilul trece în acid mevalonic (reacţia 3), un alt intermediar izolat recent care, prin condensare, în produşi neidentificaţi în întregime, duce la scualen (reacţia 4). Scualenul este capul de serie al hidrocarburilor de tip ciclopentanoperhidrofenantrenice, din care va rezulta colesterolul. El se transformă în organism succesiv în lanosterol (reacţia 5), zimosterol, de unde va deriva ergosterolul (reacţia 6), desmosterolul (reacţia 7) şi colesterolul (reacţia 8).

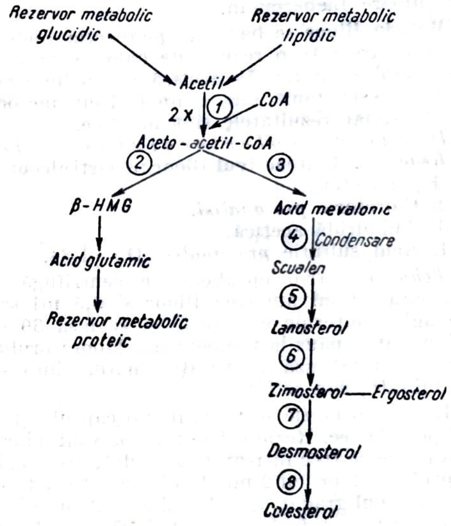

Rezervor metabolic glucidic
Rezervor metabolic lipidic
Acetil
2 x
①
CoA
Aceto - acetil - CoA
②
③
β - HMG
Acid glutamic
Rezervor metabolic proteic
Acid mevalonic
④
Condensare
Scualen
⑤
Lanosterol
⑥
Zimosterol
Ergosterol
⑦
Desmosterol
⑧
Colesterol

Fig. 93. — Biosinteza colesterolului.

Colesterolul sanguin se găseşte sub formă liberă şi esterificată. O parte este legată de complexele lipoproteice de tip α şi β. Determinările de colesterol vor trebui să cuprindă deci:

— dozarea colesterolului total;

— dozarea colesterolului esterificat şi liber;

— dozarea colesterolului esterificat şi liber din fracţiunile α-şi β-lipoproteice.

Dintre rapoartele colesterolice, cel mai utilizat în clinică este raportul colesterol esterificat/colesterol total din ser şi din fracţiunile lipoproteice.

Dozarea colesterolului în sînge

Dozarea colesterolului în sînge se poate efectua prin mai multe metode. În clinică rezultate rapide și corecte au fost obținute cu metoda Bloor și Grigaut, ambele bazîndu-se pe reacția de culoare Liebermann.

Metoda Bloor se bazează pe reacția Liebermann, care este o reacție de culoare dată de colesterol și anhidrida acetică în mediu acid. Metoda este mult mai simplă decît metoda Grigaut, iar rezultatele sînt identice.

Dozarea colesterolului total

Reactivi : 1. Reactivul Bloor (3 părți alcool + + 1 parte eter).

2. Cloroform *pro analisi*.
3. Anhidridă acetică.
4. Acid sulfuric *pro analisi* D = 1,84.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 12 ml amestec Bloor și 0,5 ml ser. Se agită puternic amestecul și se lasă 30 de minute în repaus la temperatura laboratorului. Se centrifughează la turație mare, timp de 15 minute, sau se filtrează.

Extractul eteric se trece într-o capsulă și se evaporă la sec. Reziduul se reia cu 3 ml cloroform care se trece într-un tub gradat. Se spală capsula de 2 ori cu 2 ml cloroform care se trece tot în tubul gradat. Se adaugă apoi 2 ml anhidridă acetică + 6 picături SO_4H_2 D = 1,84 și se completează la 10 ml cu cloroform.

Se lasă 20 de minute la întuneric și se citește cu filtru roșu S_{66} cuva 1 cm.

Extincția citită se raportează la curba etalon construită dintr-o serie de diluții obținute din soluția standard de 0,06 g colesterol % ml cloroform.

Cantitatea de colesterol poate fi calculată și după formula următoare: colesterol g‰ = $= E \times F$, în care E = extincția; F = factorul de pantă.

Dozarea colesterolului esterificat

Reactivi : 1. Reactivul Bloor.

2. Cloroform *pro analisi*.
3. Anhidridă acetică.
4. Acid sulfuric *pro analisi* D = 1,84.
5. Digitonină 0,5 g% în amestec de 73 ml acetonă + 9 ml alcool absolut + 18 ml apă distilată.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 12 ml amestec Bloor + 0,5 ml ser. Se agită puternic amestecul și se lasă 30 de minute în repaus la temperatura laboratorului. Se centrifughează la turație mare timp de 15 minute sau se filtrează.

Extractul eteric se trece într-o capsulă și se adaugă imediat 1 ml digitonină. Se agită ușor și se lasă la evaporat. Se reia reziduul în 3 ml cloroform și se filtrează într-un tub gradat. Se spală capsula de două ori cu 2 ml cloroform, care se trec tot în tubul gradat. Se adaugă apoi 2 ml anhidridă acetică + 6 picături de SO_4H_2 D = 1,84 și se completează la 10 ml cu cloroform.

Se lasă 20 de minute la întuneric și se citește cu filtru roșu S_{66} cuva 1 cm. Se calculează identic ca la determinarea colesterolului total.

Valori normale :
colesterol total = 1,5—2 g‰ ml ser;
colesterol esterificat = 1,1—1,3 g‰ ml ser;
colesterol liber = 0,30—0,45 g‰.

Colesterolul esterificat este 50—80% din colesterolul total.

Raportul colesterol esterificat/colesterol total = 0,85.

Metoda spectrofotometrică. Principiul metodei se bazează tot pe reacția Liebermann. Extincția se determină la spectrofotometrul cu lungimea de undă de 550 mμ.

Reactivi : 1. Acid acetic glacial *pro analisi*.

2. Anhidridă acetică *pro analisi*.
3. Acid p-toluen-sulfonic : 12 g acid paratoluen sulfonic chimic pur sînt dizolvate în 100 ml acid acetic glacial.
4. Soluție stoc de colesterol 2 mg/ml. Se dizolvă 100 mg colesterol în 50 ml acid acetic glacial.
5. Acid sulfuric concentrat *pro analisi*.

Tehnica. Se pregătesc trei eprubete în care se măsoară (ml) :

	Nr. 1 Proba de cercetat	Nr. 2 Proba în alb	Nr. 3 Proba cu soluții cunoscute
Ser	0,1	0,1	—
Soluție de colesterină	—	—	0,1
Acid acetic	0,1	—	0,1
Acid paratoluen	0,5	2,3	0,5
Anhidridă	1,5	—	1,5
Acid sulfuric	0,2	—	0,2

Acidul sulfuric se toarnă încet și se agită pentru dizolvarea completă a precipitatului format. După 20 de minute se citește absorbția. Mai întîi aparatul se egalează cu proba oarbă, apoi se măsoară absorbția probei și a soluției de comparație.

Calcul :

Concentrația colesterinei în mg/100 ml ser =

$$= \frac{\text{Absorbția probei} - \text{Absorbția probei martor}}{\text{Absorbția soluției de comparație}} \times 200.$$

Metoda Zak este o metodă directă care se bazează pe reacția Salkowski. Reacția Salkowski este o reacție de culoare dată de colesterol și clorura ferică în mediu acid.

Dozarea colesterolului total

Reactivi : 1. Acid acetic cristalizat *pro analisi.*

2. $FeCl_3$ $6H_2O$ 0,084 g în 100 ml acid acetic 10%.

3. Acid sulfuric concentrat anhidru *pro analisi.*

4. Soluție etalon : colesterol 100 mg% în acid acetic 10%. Din această soluție se face o diluție de 1/10 în soluția acetică de perclorură de fier.

Tehnica. Într-un tub de centrifugă se măsoară 0,1 ml ser, plus 4 ml soluție acetică de $FeCl_3$. Amestecul este lăsat 30 de minute la temperatura laboratorului. După centrifugare se iau 3 ml supernatant, la care se adaugă 2 ml SO_4H_2 concentrat anhidru. După 30 de minute de repaus la temperatura laboratorului se citește la spectrofotometru, cu lungimea de undă de 560 mμ și cuva de 1 cm, proba albă conținînd numai soluția acetică de Cl_3Fe. $6H_2O$.

Pentru etalonare se pregătesc 3 tuburi în care se măsoară :

Soluția etalon diluată 1/10. . . . . 1 ml; 2 ml; 3 ml.

Soluția acetică de Cl_3Fe. $6H_2O$. . . . . . . 3 ml; 2 ml; 1 ml.

Reacția se face pe 3 ml din fiecare diluție, la care se adaugă cîte 2 ml acid sulfuric concentrat anhidru. După 30 de minute se citește la spectrofotometrul cu lungimea de undă de 560 mμ, cuva de 1 cm.

Dozarea colesterolului esterificat

Reactivi : 1. Alcool-acetonă V/V.

2. Digitonină 0,5 g% în alcool 50°.

3. $FeCl_3$. $6H_2O$, 0,084 g% în 100 ml acid acetic 10%.

4. SO_4H_2 concentrat anhidru.

Tehnica. Într-un tub de centrifugă se măsoară 9 ml amestec alcool-acetonă și 1 ml ser. După agitare, tubul cu amestec este ținut în baie de apă, la fierbere, timp de 2 minute. După răcire se centrifughează, iar din supernatant se măsoară 1 ml care corespunde la 0,1 ml ser, la care se adaugă 1 ml soluție de digitonină 0,5 g%. După agitare se lasă în repaus 10 minute la temperatura laboratorului. Se centrifughează. Supernatantul este îndepărtat, iar precipitatul este spălat cu 2 ml acetonă. Tubul este uscat cu o hîrtie de filtru, iar apoi precipitatul dizolvat în 4 ml soluție acetică de clorură ferică 0,084 g%. Dizolvarea este instantanee. Din această soluție se iau 3 ml, la care se adaugă 2 ml SO_4H_2 concentrat anhidru. După 30 de minute de repaus la temperatura laboratorului, se citește reacția la spectrofotometrul cu lungimea de undă de 560 mμ, cuva de 1 cm.

Citirile făcute sînt raportate la curba obținută pentru determinarea colesterolului total.

Valori normale :

colesterol total = 2–2,60 $g^{0}/_{00}$ ml ser;
colesterol liber = 0,60–0,75 $g^{0}/_{00}$ ml ser.

$$\text{Raportul } \frac{\text{colesterol E}}{\text{colesterol T}} = 0{,}65-0{,}75.$$

Reactivii întrebuințați în această tehnică trebuie să fie foarte puri. Acidul acetic trebuie distilat în prezența anhidridei cromice pentru înlăturarea acidului glioxalic.

Acidul sulfuric anhidru se hidratează foarte repede și din această cauză rezultatele pot fi incorecte. Acidul sulfuric anhidru este foarte siropos și greu de pipetat. O picătură în plus sau în minus modifică foarte mult rezultatele.

Culoarea violetă obținută în reacție este modificată de bilirubină, hemoglobină, bromurile și iodurile existente în ser.

Metoda Zak, bazată pe reacția Salkowski, nu poate înlocui în laboratorul clinic metodele clasice bazate pe reacția Liebermann.

Valori crescute ale colesterolului seric se întîlnesc în sindroamele nefrotice, diabet, ateroscleroză și în unele forme de boli hepatice. Valori scăzute survin în distrofia galbenă a ficatului, în sarcină, în afecțiuni ale suprarenalelor, în unele decompensări cardiace, în diferitele forme de anemii, inaniție etc.

Determinarea colesterolului din fracțiunea β-lipoproteică

Într-o eprubetă se pun : 1 ml ser, 10 ml $CaCl_2$ M/40 0,2 ml heparină 1%. Amestecul se centrifughează 15 minute la 3 000 turații/min. Se îndepărtează supernatantul, iar precipitatul se redizolvă în 2 ml ser fiziologic. În această porțiune se dozează colesterolul total și cel esterificat din fracțiunea β-lipoproteică.

Determinîndu-se în prealabil cantitatea în g‰ de colesterol total şi esterificat din serul total, prin diferenţă se poate determina cantitatea de colesterol liber şi esterificat din lipoproteine :

Complexul colesterol din fracţiunea α-lipoproteică = complexul colesterol total — complexul colesterol β.

Dăm mai jos un tabel practic de lucru, pentru determinarea colesterolului total, esterificat şi liber, în ser şi în fracţiunile α- şi β-lipoproteice.

TABELUL 5

Tabel pentru determinarea colesterolului din α- şi β-lipoproteine şi ser total

	Colesterol total (1)	Esterificat (2)	Liber (3)	Raport (4)
A. Ser total		După precipitarea colesterolului liber cu digitonină	Prin diferenţa dintre colesterol total şi colesterol esterificat	Ester/Total
B. α-lipoproteine	Din supernatant după precipitarea β-lipoproteinei cu heparină	Din supernatant după precipitarea cu digitonină a colesterolului liber	Prin diferenţa dintre $(B_1 - B_2)$	Ester/Total
C. β-lipoproteine	Prin diferenţa dintre $(A_1 - B_1)$	Prin diferenţa dintre $(A_2 - B_2)$	Prin diferenţa dintre $(C_1 - C_2)$ sau $(A_3 - B_3)$	Ester/Total

Determinarea liporoteinelor serice

Lipoproteinele serice pot fi investigate în mod curent printr-o serie de teste simple, într-o măsură similară celor de disproteinemie, bazate pe precipitări specifice cu anumite substanţe.

Reacţia Kunkel$_6$ şi Kunkel$_{12}$ se bazează pe precipitarea lipoproteinelor de către NaCl în prezenţa fenolului.

Reactiv Kunkel$_6$:

Fenol cristalizat	1 g.
NaCl	6 g.
Apă	100 ml.

Reactiv Kunkel$_{12}$:

Fenol cristalizat	1 g.
NaCl	12 g.
Apă	100 ml.

Reactivii se conservă în sticle brune la temperatura laboratorului.

Tehnica. La 3,6 ml reactiv Kunkel$_6$ sau reactiv Kunkel$_{12}$ se adaugă 0,2 ml ser de cercetat. Se agită puţin amestecul şi după un repaus de 30 de minute se evaluează turbiditatea faţă de un martor. Martorul conţine 3,6 ml ser fiziologic + 0,2 ml ser de cercetat. Serurile normale rămîn clare în prezenţa reactivilor Kunkel$_6$ şi Kunkel$_{12}$.

Reacţia Burstein se bazează pe precipitarea selectivă a lipoproteinelor în prezenţa heparinei, a sulfatului de dextran sau a polivinilpirolidonei (PVP).

Reacţia Burstein cu heparină

Reactivi :

Clorură de calciu soluţie M/40

Heparină 1%.

Ser diluat 1/5.

Tehnica. Într-o eprubetă se introduc 2 ml soluţie CaCl$_2$ şi se adaugă 0,2 ml ser diluat 1/5 + 0,04 ml soluţie heparină 1%. Se agită răsturnînd eprubeta aproximativ de 10 ori, iar după 5 minute de repaus se observă rezultatul. Serurile normale rămîn clare în prezenţa acestor reactivi, pe cînd serurile patologice se tulbură şi precipită.

Reacţia Burstein cu sulfat de dextran

Reactivi : Sulfat de dextran 10%.

Clorură de calciu M.

Tehnica. 1 ml ser clar şi nehemolizat se tratează cu 0,02 ml dintr-o soluţie 10% sulfat de dextran + 0,1 ml Cl$_2$Ca M. Se agită şi imediat se citeşte reacţia. Serurile patologice dau un precipitat de β-lipoproteine; serurile normale, nu.

Reacţia Burstein cu polivinilpirolidon (PVP)

Reactivi : Polivinilpirolidonă 26%.

NaCl soluţie 10%.

Ser diluat 1/5.

Tehnica. 2 ml ser (diluat) se amestecă cu 2 ml soluție PVP care se adaugă pe marginea eprubetei, se agită prin răsturnare repetată și se apreciază rezultatul după 30 de minute. După intensitatea turbidității, rezultatele se notează cu pozitiv (+) sau intens pozitiv (++).

Testul Burstein este mult mai sensibil decît testul Kunkel. Din punct de vedere clinic, cele două teste sînt folosite în cercetarea aterosclerozei.

Reacția cu Lugol se bazează pe proprietatea iodului de a precipita lipoproteinele anormale.

Reactiv: Soluție conentrată de Lugol:

Iodură de potasiu	10 g
Iod cristalizat	5 g
Apă distilată	100 ml

Tehnica. Se amestecă o picătură de ser de cercetat cu o picătură de reactiv Lugol. După 5 minute de repaus se apreciază rezultatul. Reacția este negativă cînd amestecul rămîne limpede și este pozitivă, cînd se produce o floculare. Gradele de intensitate a reacției cu Lugol sînt: (+), (++), (+++).

Reacția este pozitivă în cancer biliar, în nefrite cronice evolutive, pneumopatii supurative, tuberculoză, infecții ale căilor biliare extrahepatice, disproteinemie, mieloame, endocardite, limfogranulomatoză și alte afecțiuni.

Testele de precipitare pot fi evaluate și la fotocolorimetrul Pulfrich cu filtru S_{61}, cuva de 1 cm. Citirile se fac pe scara de absorbție. Rezultatele se obțin scăzînd din 100, cifra citită pe scara neagră a tamburului. Valori normale 20—40 u. P.

★

Pentru o investigație completă, în clinică se practică așa-numitul „bilanț lipidic", care comportă determinarea tuturor fracțiunilor colesterolice și a testelor tip Kunkel sau Burstein.

Datele moderne au arătat că în ceea ce privește ateroscleroza, cea mai mare semnificație diagnostică o au colesterolul liber din fracțiunea β-lipoproteică și raportul colesterol esterificat/colesterol total din aceeași fracțiune. O creștere a colesterolului liber din β-lipoproteine peste valoarea de 0,40 g la 1 000 ml ser și o scădere a raportului CE/CT din β-lipoproteine sub 0,70 indică o evoluție spre ateroscleroză.

Colesterolul hepatic este sursa esențială pentru biosinteza acizilor biliari. Din el derivă acidul litocolic (reacția 1) cu produșii săi ulteriori (acid chenodezoxicolic și hiocolic — reacțiile 1a și 1b) și acidul colic (reacția 5), prin intermediarii: 7-hidroxicolesterol (reacția 2), 3,7-dihidroxicoprostan (reacția 3) și 3, 7, 12-trihidroxicoprostan (reacția 4). Sub acțiunea bacteriilor intestinale, acidul colic poate trece în acid dezoxicolic (reacția 6).

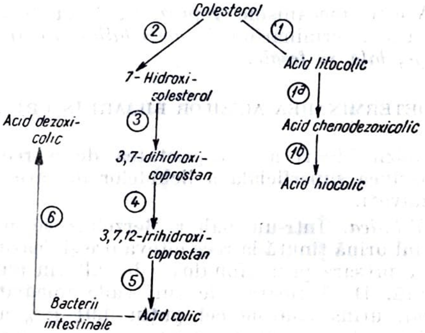

Colesterol
②
①
7-Hidroxi-colesterol
Acid litocolic
1a
Acid dezoxi-colic
③
Acid chenodezoxicolic
1b
3,7-dihidroxi-coprostan
Acid hiocolic
④
⑥
3,7,12-trihidroxi-coprostan
⑤
Bacterii intestinale
Acid colic

Fig. 94. — Biosinteza acizilor biliari.

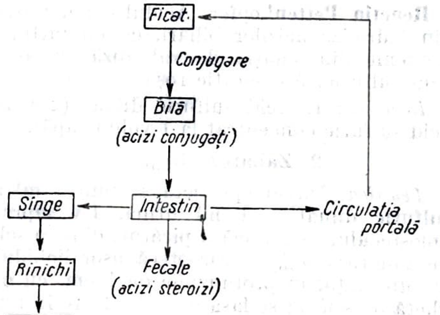

Ficat
Conjugare
Bilă
(acizi conjugați)
Singe
Intestin
Circulația portală
Rinichi
Fecale
(acizi steroizi)
Urină
(nedecelabil)

Fig. 95. — Circuitele acizilor biliari.

Acizii biliari se elimină prin bilă sub formă conjugată cu taurina și glicocolul. Această conjugare este precedată de activarea acidului biliar prin ATP și CoA:

Acidul COLIC + ATP + CoA → COLIL — CoA + AMP+ + PP COLIL — CoA + TAURINA → Acidul TAUROCOLIC ("conjugare") + CoA.

De la nivelul bilei, acizii biliari conjugaţi pot fi eliminaţi prin fecale sub forma metabolizată de bacterii la acizi steroizi sau resorbiţi prin circulaţia portală la ficat. O mică parte a lor poate trece în sînge şi se elimină în cantităţi practic nedeterminabile curent, prin urină.

Aceste mecanisme reprezintă baza biochimică a determinărilor de *acizi biliari în urină, sînge, bilă şi fecale.*

DETERMINAREA ACIZILOR BILIARI ÎN URINĂ

Acizii biliari au proprietatea de a reduce tensiunea superficială a lichidelor în care sînt dizolvaţi.

Tehnica. Într-un pahar Berzelius se pun: 20 ml urină ţinută la rece cîteva ore şi deasupra ei se presară prin tifon floare de sulf fin pulverizată. Dacă floarea de sulf cade imediat la fund, urina conţine cel puţin 0,01 g% acizi biliari; dacă pentru aceasta este necesară o agitare uşoară, urina conţine 0,005 g% acizi biliari. Acizii biliari lipsesc atunci cînd floarea de sulf, chiar după o agitare, continuă să plutească la suprafaţă. Reacţia nu este specifică pentru că alcoolul, cloroformul, acidul salicilic, acidul acetic, timolul etc. scad de asemenea tensiunea superficială a urinii.

Reacţia Pettenkopfer. Acidul colic, provenit din hidroliza acizilor biliari, dă cu furfurolul, provenit din soluţia de zaharoză tratată cu acid sulfuric, o coloraţie roşie.

Reactivi: 1. Acid sulfuric diluat (2 volume acid sulfuric concentrat la 1 volum apă).

2. Zaharoză 5%.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 4 ml acid sulfuric diluat + 1 ml urină. La suprafaţa amestecului se adaugă 3 picături dintr-o soluţie de zaharoză 5%, se amestecă uşor lichidul de la suprafaţă, în profunzime de 1 cm, cu o baghetă de sticlă; se lasă apoi 3—4 ore în repaus la temperatura laboratorului. În prezenţa sărurilor biliare apare un inel roşu-violet caracteristic. Reacţia este specifică şi foarte sensibilă, fiind pozitivă chiar pentru 0,20 g/litru săruri biliare.

Interpretare. Acizii biliari apar în urină în sindroamele de retenţie biliară, în hepatite sau în obstrucţia căilor biliare. În icterul hemolitic, urina nu conţine acizi biliari. Pentru determinările la nivelul sîngelui, bilei şi fecalelor vezi paragrafele respective.

ROLUL FICATULUI ÎN METABOLISMUL PROTEIC

Ficatul intervine atît în sinteza proteinelor plasmei, avînd o acţiune marcată, cît şi în catabolismul proteic. Funcţia protidogenică este legată în special de formarea albuminei serice, proces de mare specificitate, astfel că hipoalbuminemiile reflectă de obicei o leziune a parenchimului hepatic.

Globulinele sînt produse de elemente derivate din sistemul reticulo-endotelial, ficatul participînd prin componenta sa mezenchimală. Procesul de biosinteză proteică este deosebit de complex. După cum se vede din schemă, acizii aminaţi sînt în prealabil activaţi printr-o enzimă specifică (E_1) şi ATP; apoi sînt cuplaţi cu CTP (citidin-trifosfat) şi acid ribonucleic (faza 2—3), formă sub care sînt transportaţi pînă la microzomi, unde se ordonează specific pe modelul acidului ribonucleic ribozomal (faza 4—5). Catena polipeptidică, o dată constituită, se dispune în spaţiu după caracterele specifice ale proteinei respective (faza 6).

Integritatea organului se traduce sub forma unui echilibru armonios între albumine şi fracţiunile globulinice. În cazuri patologice, tulburarea acestui echilibru se manifestă prin „disproteinemiile'' puse în evidenţă cu aşa-numitele „teste de labilitate serică'' sau prin fracţionarea electroforetică.

Trebuie precizat de la început că fenomenele fiind foarte complexe, testele de labilitate sau de disproteinemie, cum sînt uneori numite, nu reuşesc să oglindească fidel starea fiziologică sau patologică a ficatului. Multiplele reacţii utilizate se adresează uneia sau alteia din fracţiunile proteice, de unde necesitatea utilizării unor „constelaţii'' sau „baterii'' de teste.

Fracţionarea electroforetică nu poate înlocui întrutotul determinările chimice, întrucît ea exprimă raportul cantitativ al fracţiunilor şi nu poate evidenţia în toate cazurile alterările calitative. Astfel, prezenţa unor globuline patologice, cantitativ normale, poate scăpa uneori determinărilor electroforetice şi se poate evidenţia prin testele de disproteinemie.

Dozarea substanţelor proteice

Metoda volumetrică. Prin procedeul Kjeldahl, se determină azotul total şi azotul neproteic; diferenţa dintre valorile obţinute pentru azotul total şi pentru cel neproteic se înmulţeşte cu 6,25; rezultatul reprezintă cantitatea în g de proteină.

Metoda refractometrică (metoda de orientare). Se măsoară refracţia luminii prin proteine cu ajutorul refractometrului. Determinarea se face în 5 minute cu cîteva picături de ser. Serul trebuie să fie clar; serul icteric sau chilos, precum şi serul provenit de la diabetici sau uremici nu pot fi utilizate, deoarece conţin şi alte substanţe care refractă lumina (vezi „Metode fizico-chimice").

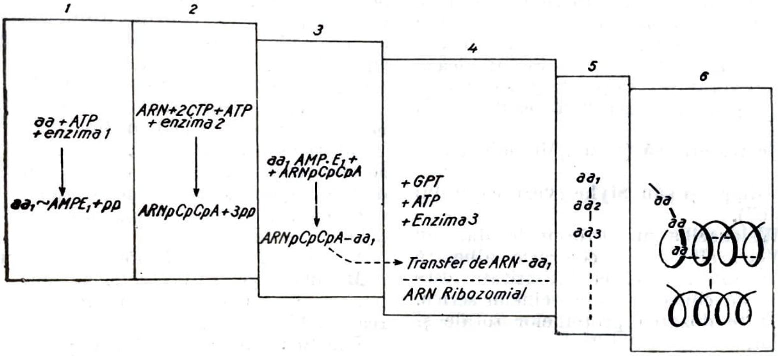


Fig. 96. — Schema principalelor etape în biosinteza proteinelor:

1 — etapa de activare; 2 — prepararea catenei de transfer; 3 — esterificarea acidului ribonucleic de transfer; 4 — secvenţionalizarea specifică; 5 — formarea catenei peptidice; 6 — etapa de spaţializare.

Metoda gravimetrică. Se precipită proteinele totale şi fracţiunile serice cu sulfat de amoniu, iar precipitatul se usucă şi se cîntăreşte.

Reactivi:

a) Tampon-acid acetic: se dizolvă 118 g acetat de sodiu cu $3\,H_2O$ în 500 ml apă distilată, la care se adaugă 56 ml acid acetic glacial şi se aduce la 1 000 ml cu apă distilată.

b) Soluţie saturată de sulfat de amoniu. 100 g sulfat de amoniu sînt dizolvate la fierbere în 125 ml apă distilată. Soluţia obţinută are pH-ul 6,0—6,4.

c) Alcool 96°.

d) Eter.

e) Amestec alcool-eter (3 : 1 v/v).

Proteine totale. Într-o eprubetă se măsoară 1 ml ser, 3 ml tampon-acetat şi cîteva picături de soluţie saturată de sulfat de amoniu. Amestecul se ţine o oră în baie de apă la fierbere. În acest timp se prepară două filtre cantitative cu greutate egală, se aşază unul într-altul şi, prin ele, se filtrează soluţia cu precipitatul din eprubetă, se spală eprubeta şi precipitatul cu apă distilată pînă ce apele de spălare nu mai conţin sulfat de amoniu (tratînd filtratul cu clorură de bariu nu mai precipită). Se spală apoi precipitatul cu un amestec de alcool-eter şi apoi numai cu eter, se lasă la etuvă la 105°, pînă la greutate constantă; se cîntăresc cele două filtre, iar diferenţa lor reprezintă proteinele totale la 1 ml ser. Valoarea obţinută se înmulţeşte cu 100, pentru a exprima în grame proteinele totale la 100 ml ser.

Albumine. Într-un tub de centrifugă se măsoară 1 ml ser, 2 ml apă distilată şi 3 ml soluţie saturată de sulfat de amoniu. Se lasă amestecul să stea 3 ore şi apoi se centrifughează. Într-o eprubetă se pun 3 ml din supernatantul clar + 3 ml tampon-acid acetic; se fierbe amestecul cel puţin o jumătate de oră în baia de apă; între timp se prepară 2 filtre cu greutate egală. Se filtrează precipitatul, se spală eprubeta şi precipitatul de pe filtru cu apă, pînă cînd apele de spălare nu mai precipită în prezenţa clorurii de bariu, ceea ce denotă că apele nu mai conţin sulfat de amoniu. Se spală precipitatul cu amestec alcool-eter şi la sfîrşit numai cu eter. Se lasă filtrul cu precipitat la 105°, pînă la greutate constantă; se cîntăresc cele două filtre, iar diferenţa lor reprezintă cantitatea de albumină la 1 ml ser. Valoarea obţinută se înmulţeşte cu 100, pentru a exprima rezultatul la 100 ml ser.

Globuline. Acestea se obţin prin diferenţa dintre proteinele totale şi albumine.

Precipitarea proteinelor şi a albuminelor cu soluţie de sulfat de amoniu saturată se poate face în tuburi de centrifugă. Procedeul prezintă avantajul că spălările precipitatului cu alcool şi eter se fac prin centrifugări repetate, îndepărtînd astfel filtrele tarate. Uscarea precipitatului se face în tub la 105°, iar cîntărirea se poate executa în două feluri :

a) precipitatul uscat din tub se poate trece pe o sticlă de ceasornic cu tara cunoscută;

b) se ia tara tubului gol, care se scade din greutatea tubului cu precipitat. Se calculează greutatea precipitatului obţinut şi se înmulţeşte cu 100, pentru a exprima rezultatul la % ml ser.

Metoda electroforetică (vezi „Metode fizico-chimice").

Metoda Philipps şi van Slyke (vezi capitolul „Hematologie").

Metoda Weichselbaum. Proteinele dau cu reactivul Weichselbaum o coloraţie albastră (reacţia biuretului), a cărei intensitate este proporţională cu concetraţia proteinelor serice. Metoda permite dozarea proteinelor totale şi a albuminelor.

Reactivi :

a) Hidroxid de sodiu 10 g%.

b) Tampon-acetat : 5,6 g acid acetic glacial + 11,2 g acetat de sodiu cristalizat + 94 ml apă distilată.

c) Soluţie saturată de sulfat de amoniu. 100 g $SO_4(NH_4)_2$ se dizolvă la fierbere în 125 ml apă; pH-ul soluţiei trebuie să fie de 6,2—6,4.

d) Reactivul Weichselbaum (R.W.) conţine : sare Seignette (tartrat dublu de Na şi K) 45 g, hidroxid de sodiu 30 g, sulfat de cupru 15 g; sînt dizolvate perfect în apă, apoi se adăugă 5 g iodură de potasiu şi se aduce la 1 000 ml cu apă distilată.

Proteine totale. Se pregătesc două eprubete notate cu numărul 1 şi 2.

Eprubeta nr. 1 (proba-martor) conţine : 2 ml H_2O + 1 ml hidroxid de sodiu 10% + 3 ml R. W.

Eprubeta nr. 2 (proba de cercetat) conţine : 1,8 ml H_2O + 0,2 ml ser + 1 ml hidroxid de sodiu 10% + 3 ml R.W.

După 30 de minute se citesc probele la fotometrul Pulfrich cu filtrul S_{57} şi cuva de 0,5 cm.

Calcul : g proteine $^0/_{00}$ ml ser = extincţia × 200.

Valori normale : 60—80 g$^0/_{00}$.

Albumine. Într-o eprubetă conică se măsoară 2 ml ser + 1 ml H_2O distilată + 3 ml $SO_4(NH_4)_2$ soluţie saturată. În aceste condiţii se precipită globulinele. Probele sînt lăsate în repaus cel puţin 3 ore (se pot lăsa şi pînă a doua zi la frigider), apoi se centrifughează. Din supernatant se iau 3 ml, la care se adaugă 3 ml tampon-acetat; amestecul se fierbe pe baie de apă 30 de minute, după care urmează centrifugarea. Se decantează supernatantul, iar precipitatul care, conţine albuminele, se spală de două ori cu cîte 5 ml H_2O distilată fierbinte. Precipitatul spălat se dizolvă în 5 ml NaOH 10%, se încălzeşte pînă la 30—50°, temperatură la care dizolvarea este completă, apoi se centrifughează, iar la 1 ml lichid clar se adaugă 2 ml H_2O + 3 ml R.W. După 30 de minute se citeşte extincţia la acelaşi filtru S_{57} şi cuva de 0,5 cm, ca la proteinele totale.

Calcul : g albumine $^0/_{00}$ ml ser = extincţia x 200.

Valori normale : 45—50 g$^0/_{00}$ albumine.

Metoda spectrofotometrică pentru determinarea proteinelor totale în sînge se bazează pe reacţia biuretului.

Reactiv : reactivul biuret; într-un balon cotat de 1 000 ml se dizolvă 250 g hidroxid de sodiu şi 4 g sulfat de cupru.

Tehnica pentru proteine totale Se pregătesc 4 eprubete. În eprubeta nr. 1 se măsoară 2 ml apă distilată, 0,2 ml ser, 4 ml biuret şi 3 ml eter.

În eprubeta nr. 2 se măsoară 2,2 ml apă distilată, 4 ml reactiv biuret şi 3 ml eter.

În eprubeta nr. 3 se măsoară 0,1 ml soluţie de proteină cu concentraţia de 6,3 g%, apoi se adaugă 4 ml reactiv biuret şi 3 ml eter.

În eprubeta nr. 4 se măsoară 0,2 ml soluţie de proteină cu concentraţia de 12,6 g%, apoi se adaugă 4 ml reactiv biuret şi 3 ml eter.

Toate probele sînt centrifugate pînă ce soluţia devine clară. Măsurarea soluţiilor colorate trebuie să se facă imediat sau cel mult în decurs de o oră. Se reglează lungimea de undă la 540 mμ, cuva de 1 cm. Se egalează aparatul cu proba nr. 2 şi se măsoară absorbţia probei de determinat şi a soluţiilor de comparaţie. Valorile obţinute ale soluţiilor de comparaţie se înscriu pe hîrtia milimetrică, în raport cu concentraţia, şi apoi se determină concentraţia probei.

Tehnica pentru albumine. Reactivii sînt aceiaşi ca la dozarea proteinelor totale, plus o soluţie de sulfat de sodiu 22,5%, care este folosită pentru precipitarea globulinelor.

Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 4 ml soluţie sulfat de sodiu 22,5%, 0,2 ml ser şi 3 ml eter. Se agită, se astupă eprubeta cu un dop de cauciuc, pentru a evita evaporarea, şi se centrifughează atîta timp pînă ce soluţia se limpezeşte. Globulina precipitată trebuie să apară ca o peliculă la suprafaţa de separare între soluţia de eter şi soluţia de sulfat de sodiu. Se măsoară 2 ml din stratul de sulfat de sodiu care conţine albuminele şi se adaugă 4 ml reactiv biuret şi 3 ml eter. Se agită şi se centrifughează pînă ce soluţia devine clară.

Comparativ cu proba de cercetat, se prepară două probe cu concentraţii de albumină cunoscută, una conţinînd 6,3 g şi alta 12,5 g albumină %. La fiecare se adaugă 4 ml reactiv biuret şi 3 ml eter. Se fac citirile la lungimea de undă de 540 µm, cuva de 1 cm. Calculul este acelaşi ca pentru proteinele totale.

TABELUL 52

Valorile normale ale proteinelor serice

Proteine totale	6,5–8	g % ml ser.
Albumine totale	4,5–5,5	g % ml ser.
Globuline	1,5–3,4	g % ml ser.

Raportul $\frac{\text{albumine}}{\text{globuline}} = 1{,}6-2{,}2.$

Proteinele totale sînt crescute în bolile infecţioase cronice, în pierderile importante de apă, diaree, vărsăturile incoercibile, deshidratarea din stenoze esofagiene şi pilorice, diabetul insipid, mielomul multiplu. Proteinele totale sînt scăzute în nefroze, anemii, hemoragiile acute, în hidremia consecutivă afecţiunilor renale, în edemul de foame, în hipoproteinemiile consecutive unor boli infecţioase consumptive, în tumorile maligne, ca şi în afecţiunile hepatice cronice.

Albuminele sînt scăzute în nefritele însoţite de albuminurii, hemoragii, inaniţie, supuraţii cronice, ciroze hepatice, hepatită cropurală, stări de şoc. În cazuri rare se semnalează forme de analbuminemie congenitală.

Globulinele pot fi crescute în tumorile maligne (de exemplu, plasmocitomul), macroglobulinemia Waldenström, în nefroze, în inflamaţiile şi infecţiile cronice, în graviditate, leziunile hepatice.

La o scădere a albuminelor corespunde o creştere compensatoare a globulinelor şi invers. De obicei, creşterea globulinelor şi scăderea albuminelor determină o accelerare a vitezei de sedimentare a eritrocitelor.

Explorarea echilibrului proteic al plasmei comportă determinări electroforetice şi executarea de ,,teste de disproteinemie''. Pentru determinările electroforetice, vezi capitolul ,,Metodele fizico-chimice de analiză''.

REACŢIILE DE DISPROTEINEMIE

În mod curent, dezechilibrul proteic se pune în evidenţă prin reacţiile de precipitare denumite incorect ,,teste hepatice''. Acestea se efectuează pe ser proaspăt nehemolizat şi constau din flocularea sau coagularea proteinelor plasmatice.

Se utilizează electroliţi, substanţe coloidale, precipitanţi organici, apă distilată.

Reacţiile de disproteinemie sînt motode de rutină executabile rapid cu reactivi şi aparatură simplă, dar nu pot fi considerate ca reacţii hepatice specifice, fiind pozitive şi în unele afecţiuni renale, precum şi în unele procese infecţioase sau inflamatorii; din acest motiv, rezultatele trebuie întotdeauna comparate cu datele furnizate de alte mijloace de investigaţie.

★

Reacţia Takata-Ara-Baumann este o reacţie de floculare, care se bazează pe acelaşi principiu ca şi reacţia Takata-Ara.

Reactivi: 1. Soluţie de Hg Cl_2 5%.

2. Soluţie de NaCl 2,5%.

Din aceste două soluţii se formează 10 diluţii după tabelul de mai jos, diluţii care pot fi păstrate timp îndelungat la +4° în sticle bine închise şi vor fi utilizate la efectuarea probei:

Nr. eprubetei	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$HgCl_2$ 5%	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
ClNa 2,5%	94	92	90	88	86	84	82	80	78	76
Concentraţia Cl_2Hg (g%)	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,1	1,2

Tehnica. Se iau 10 eprubete de hemoliză, în care se introduc cîte 0,2 ml ser nehemolizat, se adaugă cîte 0,2 ml reactiv din tuburile corespunzătoare numerotate de la 1 la 10. Se lasă 15 secunde în repaus, apoi se agită eprubetele, iar după un minut se examinează.

Dacă apare o precipitare în eprubetele nr. 1, 2, 3, proba este intens pozitivă.

Dacă precipitarea apare abia în eprubetele nr. 4, 5, proba este pozitivă.

În eprubetele nr, 6, 7, proba este slab pozitivă.

În eprubetele nr. 8, 9, 10, proba este negativă.

De obicei se încearcă cu o singură soluție, de exemplu cu soluția eprubetei nr. 5 și apoi se continuă pe scară de diluții la dreapta, în cazul cînd constatăm un rezultat negativ, sau la stînga, în cazul unui rezultat pozitiv. Indică o scădere în concentrația albuminelor și o creștere a fracțiunilor β și γ -globulinice.

Reacția Gross. Serul este tratat cu soluție Hayem și se urmărește apariția unei prime floculări reversibile, care dispare prin agitare.

Reactiv. Soluție Hayem : 0,5 g sublimat +5 g sulfat de sodiu cristalizat și 2 g clorură de sodiu se dizolvă în 200 ml apă distilată.

Tehnica. Într-o eprubetă de hemoliză se măsoară 1 ml ser nehemolizat și dintr-o microbiuretă se adaugă picătură cu picătură soluție Hayem. După fiecare picătură se privește în zare, pentru a urmări apariția unei floculații. Se agită totdeauna eprubeta înaintea unui nou adaos. Se procedează în acest mod pînă se ajunge la apariția unei floculații mai pronunțate la suprafața serului, ca un inel îngust laburiu care cedează după o agitare mai energică. Din această cauză reacția se numește reversibilă. Se notează numărul de mililitri de soluție Hayem întrebuințată.

Se continuă apoi titrarea cu soluție Hayem, pînă se ajunge la o tulburare permanentă, ireversibilă, în formă de nor, care, prin lăsare în repaus, se sedimentează. Se notează din nou numărul de mililitri de soluție Hayem, stabilind astfel granița superioară sau flocularea ireversibilă.

Valori normale. Granița inferioară de floculare are loc, în mod normal în jurul a 1,5 ml soluție Hayem. Granița superioară în mod normal se produce în jurul a 2,5 ml soluție Hayem. Scăderea uneia din granițe se produce proporțional cu scăderea celeilalte. Limita inferioară de floculare este scăzută sub cifrele normale în alterările celulare hepatice, traducînd o insuficiență cantitativă sau calitativă a parenchimului. Reacția Gross este considerată ca un test de leziune parenchimatoasă. Indică o scădere a albuminelor și o creștere în special a γ-globulinelor.

Reacția Gross modificată. Se pun într-o eprubetă 0,5 ml ser și 0,5 ml soluție Hayem, apoi se agită. Dacă imediat după agitare sau în primele 2 ore apare un precipitat, rezultatul se notează cu intens pozitiv (+++), după 4 ore rezultatul se notează cu pozitiv (++), iar după 24 de ore se notează cu slab pozitiv (+). Reacțiile în care se observă o opalescență fără precipitat sînt considerate negative.

Reacția Weltmann. Principiul metodei se bazează pe precipitarea globulinelor din ser în contact cu o anumită cantitate de clorură de calciu, la cald. Cantitatea de clorură de calciu variază cu starea normală sau patologică a serului.

Reactiv : 5 g clorură de calciu anhidră sînt dizolvate în 100 ml apă distilată. Concentrația soluției de 5% clorură de calciu se verifică prin titrare cu azotat de argint N/10. În 12 baloane cotate a 100 ml se pun cantități crescînde din soluția de 5% clorură de calciu și apoi se completează pînă la semn cu apă distilată. Soluțiile se pot păstra timp îndelungat la temperatura de +4°.

Numărul balonului cotat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Clorură de calciu 5 g% (ml)	1	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,20	0,10
Concentrația clorurii de calciu	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25	0,22	0,20	0,17	0,15	0,1	0,05

Tehnica. Se introduc într-o serie de 12 eprubete, numerotate de la 1 la 12, cîte 5 ml soluție de clorură de calciu din fiecare diluție în ordinea numerică; se adaugă cîte 0,1 ml ser nehemolizat în fiecare eprubetă, apoi se agită puternic și se fierb în baie de apă 15 minute; după răcire se examinează rezultatele. În unele eprubete se formează coaguli care tind să se depună pe fundul eprubetei, iar lichidul supernatant se limpezește mai mult sau mai puțin complet. În alte eprubete se observă numai o turbiditate, fără formare de cheaguri. Se notează de la stînga la dreapta numărul eprubetelor în care s-a produs coagularea. Se notează ultima eprubetă în care s-a produs coagularea cu flocoane. Lipsa coagulării sau o opalescență slabă fără sediment se interpretează ca rezultat negativ.

Interpretare. Normal, coagularea merge pînă la eprubetele nr. 6 sau 7. Coagularea produsă la o eprubetă inferioară numărului 6 indică o deviere spre stînga sau scurtarea benzii de coagulare. Coagularea în eprubete superioare eprubetei 6 indică o deviere la dreapta sau alungirea benzii. Serurile patologice se caracterizează fie prin scurtarea benzii de coagulare sau devierea ei la stînga, corespunzînd unei coagulări la concentrații mai mari de clorură de calciu, fie prin alungirea benzii de coagulare sau devierea la dreapta, corespunzînd unei coagulări la concentrații mai mici de clorură de calciu.

Devierea la stînga indică creşterea pragului de coagulare cu creşterea globulinelor α, β sau a tuturor globulinelor.

Devierea la dreapta indică scăderea pragului de coagulare şi o creştere a γ-globulinelor.

Reacția Wuhrmann. Cadmiul produce precipitarea serurilor care conțino cantitate crescută de α- şi γ-globuline şi o cantitate scăzută de albumine.

Reactiv : sulfat de cadmiu $4^0/_{00}$. Conservarea reactivului este indefinită.

Tehnica. La 0,4 ml ser proaspăt se adaugă 0,2 ml soluție de sulfat de cadmiu. În cazul unei reacții pozitive, imediat sau în 5 minute, apare o turbiditate mai mult sau mai puțin intensă. Tulburarea nu se produce cu serurile normale. Reacția este intens pozitivă la floculare imediată sau pînă la un minut; este pozitivă la floculare pînă la 5 minute; slab pozitivă, dacă după 5 minute apare o slabă tulburare; negativă, dacă amestecul rămîne clar.

Reacția Kunkel este o reacție de precipitare a serului cu sulfat de zinc. Indică o creştere a fracțiunii γ-globulinice.

Reactivi : Sulfat de zinc tamponat, cu pH = 7,5.

Sulfat de zinc $7H_2O$	0,024 g.
Veronal sodic	0,21 g.
Veronal	0,28 g.
Apă distilată *ad.*	1 000 ml.

Tehnica. La 0,1 ml ser proaspăt se adugă 6 ml reactiv sulfat de zinc tamponat.

Reacția este pozitivă, dacă după 30 de minute se produce o turbiditate mai mult sau mai puțin intensă, care se poate aprecia fie la scara de timol, fie la fotometrul Pulfrich. La Pulfrich se citeşte pe scara de absorbție cu filtrul albastru S_{47}, cuva de 0,5 cm.

Valori normale : 2–8 U.M.L. sau 30 u. Pulfrich.

Reacția Huerga-Popper este o reacție de precipitare a serului cu sulfat de amoniu. Este indicată în literatură ca unul din cele mai fidele teste care indică o creştere a γ-globulinelor.

Reactiv Huerga-Popper : soluția de sulfat de amoniu la pH 5–6 obținut din :

Sulfat de amoniu	189 g.
Clorură de sodiu	29,3 g.
Apă distilată	1 000 ml.

Tehnica. La 0,1 ml ser proaspăt se adaugă 5 ml reactiv Huerga-Popper.

Reacția este pozitivă dacă după 30 de minute se produce o turbiditate mai mult sau mai puțin intensă, care se poate aprecia fie la scara de timol, fie la fotometrul Pulfrich. La Pulfrich se citeşte pe scara cu filtrul albastru S_{47} cuva de 0,5 cm.

Valori normale : 1–6 U.M.L. sau 10–30 u. Pulfrich.

Testul Huerga-Popper ca şi testul Kunkel pun în evidență o cantitate crescută de γ-globuline. Aceste două teste nu concordă din cauza interferenței factorilor secundari.

Albuminele şi uroproteinele inhibează testul Kunkel şi nu inhibează testul Huerga-Popper.

Cu testul Kunkel se precipită o euglobulină anormală, cu testul Huerga-Popper nu.

Cu serul încălzit la 56°, testul Huerga-Popper este mai sensibil decît testul Kunkel.

Reacția cu sulfat de cupru este o reacție de precipitare a serului cu sulfat de cupru.

Reactiv : sulfat de cupru 0,23 g %. La întrebuințare se diluează soluția 0,23 $g^0/_{00}$ cu apă distilată în proporție de 1/10.

Tehnica. La 0,1 ml ser se adaugă 6 ml reactiv diluat.

Rezultate. În cazul unei reacții pozitive, după 30 de minute apare o turbiditate mai mult sau mai puțin intensă, care se notează cu +, ++, +++.

Reacția se adresează în special fracțiunii γ-globulinice.

Reacția Hanger. Se adresează în special fracțiuni γ-globulinice. Urmăreşte turbiditatea provocată de flocularea colesterol-cefalină cu proteinele serice.

Reactivi : Cefalină.
Colesterol.
Eter.
Mertiolat.

Antigenul cefalină-colesterol se prepară în felul următor : 100 mg cefalină şi 300 mg colesterol se extrag cu 8 ml eter. Din extractul eteric se pune 1 ml în 35 ml apă distilată caldă, la 60–70°. Se fierbe pînă la reducerea volumului la 30 ml, apoi se răceşte, obținîndu-se reactivul sub formă de emulsie. Reactivul astfel preparat, la care se adaugă mertiolat în concentrație de 1/10 000, poate fi păstrat la +4°, timp de 10 zile. Liofilizat, se păstrează timp nelimitat.

Tehnica. La 0,2 ml ser se adaugă 4 ml ser fiziologic și 1 ml reactiv. Se agită și se lasă amestecul în repaus la temperatura laboratorului timp de 24 de ore, cînd se evaluează turbiditatea sau floculareа. Serul normal nu produce nici o floculare. Intensitatea reacției se exprimă pozitiv sau intens pozitiv. Intensitatea floculării se datorește creșterii globulinelor.

Reacția este pozitivă atît în hepatite, cît și în ciroze; ea este negativă în icterele prin obstrucție. Reacția poate servi pentru diagnosticul diferențial al unui icter.

★

Probele de disproteinemie provocate cu precipitanți organici pun în evidență o creștere a β- și γ-globulinelor și o scădere a albuminelor.

Reacția timol (metoda Mac Lagan). Soluția-tampon pH 7,8 saturată cu timol produce precipitarea serurilor disproteinemice. Reacția se bazează pe formarea unui complex de globuline, fosfolipide, colesterol și timol. Complexul lipido-proteic anormal supus electroforezei migrează în fracțiunea β-globulinelor.

Atît creșterea γ-globulinelor, cît și prezența unor complexe lipido-proteice anormale sînt responsabile de pozitivarea reacției. Fischer și Gorta afirmă că pozitivarea reacției se datorește exclusiv unei paraproteine rezultată din alterarea parenchimului hepatic și care precipită la temperatura – 5° cu 10% alcool.

Reactivi: 1. Tampon veronal pH 7,8 : 1,03 g veronal sodic (dietilbarbiturat de sodiu) + 1,38g veronal (acid dietilbarbituric) la 500 ml apă distilată.

2. Soluția timol: 10 g timol la 100 ml alcool 96°.

Reactivul tampon veronal-timol se prepară adăugînd 1 ml soluție timol la 100 ml tampon veronal pH 7,8. Reactivul preparat în aceste condiții nu se tulbură, așa cum se întîmplă deseori dacă se folosește metoda originală care constă în dizolvarea a 3 g timol cu 500 ml apă tampon pH 7,8. Soluția se agită, se încălzește și se lasă în repaus 24 de ore, apoi se filtrează și se lucrează numai cu soluția clară.

3. Clorură de bariu cristalizată cu 2 H_2O 1,15 g la 100 ml apă.

4. Acid sulfuric N/5.

Scara-etalon. Într-un balon cotat de 100 ml se introduc 3 ml din soluția clorură de bariu 1,15%+97 ml soluție acid sulfuric N/5, obținîndu-se soluția standard. Amestecul se face răcind balonul sub un curent de apă. Opalescența acestei soluții este echivalentă cu 20 u. Mac Lagan. Prin diluții succesive ale soluției standard cu acid sulfuric se obține o gamă de 10 etaloane.

Etaloane	Soluția standard (ml)	SO_4H_2 N/5	Unități
1	10	—	20
2	9	1	18
3	8	2	16
4	7	3	14
5	6	4	12
6	5	5	10
7	4	6	8
8	3	7	6
9	2	8	4
10	1	9	2

Înainte de întrebuințare, eprubetele standard sînt omogenizate prin agitare.

Tehnica. La 0,1 ml ser proaspăt se adaugă 6 ml reactiv tampon veronal-timol, se agită și după 30 de minute se evaluează turbiditatea.

Valori normale : 0–4 u. Mac Lagan.

Turbiditatea se compară cu gama de etaloane, exprimîndu-se în unități Mac Lagan. Se poate, de asemenea, măsura densitatea optică și la fotometrul Pulfrich, fără dispozitiv nefelometric cu filtru S_{47} și cuvele de 0,5 cm, citind pe scara de absorbție a tamburului. Rezultatul se obține scăzînd din 100 cifra citită pe tambur.

Valori normale : 5–20 u.P.

Convertirea unităților Pulfrich în unități Mac Lagan se obține împărțind unitățile Pulfrich la 5.

Testul cu timol nu este specific pentru ficat, fiind pozitiv și în alte afecțiuni, ca : reumatism poliarticular acut, boala Nicolas-Favre, cancer, tuberculoză, malarie, endocardită malignă. Nespecificitatea sa nu îi reduce valoarea pentru explorarea funcțională a ficatului. Reacția este pozitivă în icterul hepatic și negativă în cel prin obstrucție, deci poate servi la diferențierea acestor ictere.

Reația Gaté. O soluție de formol 40% produce gelificarea serurilor patologice. Investighează în special fracțiunea γ-globulinică.

Reactiv : Formol 40% neutralizat la cald cu carbonat de sodiu sau hidroxid de sodiu în prezența fenolftaleinei.

Tehnica. La 1 ml ser se adaugă 2 picături de formol.

Reacţia intens pozitivă = gelificare după 10 minute.

Reacţii pozitive = gelificare după 2 ore.

Reacţie slab pozitivă = gelificare după 24 de ore.

Reacţie negativă = lipsa gelificării.

Reacţia Kunkel. Se bazează pe proprietatea pe care o au lipoproteinele serice de a flocula în prezenţa unei soluţii de fenol.

Reactiv:	NaCl	120 g;
	Fenol distilat	10 g;
	Apă	1 000 ml.

Se dizolvă substanţele de mai sus în apă caldă şi se filtrează; reactivul trebuie să fie limpede şi incolor.

Tehnica. Se amestecă într-o eprubetă 0,1 ml ser şi 1,8 ml reactiv, se agită, iar după 30 de minute se face examinarea rezultatelor. Intensitatea reacţiei se exprimă pozitiv sau intens pozitiv.

Reacţia cu apă distilată. Reacţia se bazează pe acţiunea precipitantă a apei distilate asupra serurilor cu conţinut mare în globuline, în special β şi γ.

Tehnica. Se măsoară exact 5 ml apă bidistilată, la care se adaugă 0,1 ml ser de cercetat. Se agită şi se lasă 24 de ore în repaus. Ca martor serveşte un alt tub, în care se pun 5 ml soluţie de clorură de sodiu $9^{0}/_{00}$ şi se adaugă 0,1 ml ser de cercetat. În timpul executării reacţiei se evită suflatul în pipetele cu care se măsoară apa şi serul, întrucît acidul carbonic din aerul alveolar influenţează apreciabil reacţia.

Aprecierea lor se face după 24 de ore cu ochiul liber, în comparaţie cu tubul martor, notîndu-se rezultatul cu + sau —.

Rezultate. Tubul care conţine ser de cercetat nu diferă, în cazuri normale, de tubul martor. Rezultatele pot fi comparate fie cu etaloanele de la reacţia timol, notîndu-se rezultatul în unităţi M.L., normal 0—2,5 U.M.L., fie cu fotometrul Pulfrich, utilizînd cuvele de 1 cm şi filtrul S_{47}, normal 0—5 diviziuni. Pentru calcul se procedează astfel: se citesc pe tamburul aparatului cifrele scrise în negru, rezultatul este exprimat prin cifra care rămîne, scăzînd din 100 cifra citită.

Reacţia este pozitivă în hepatite.

★

Reacţiile cu roşu coloidal şi aur coloidal pun în evidenţă o creştere a euglobulinelor. Tehnicile sînt identice, iar rezultatele sînt pozitive la o proporţie de euglobuline de peste 2 $g^{0}/_{00}$.

Reacţia Ducci cu roşu coloidal este un test de mare valoare în ciroze. Acesta investighează γ-globulinele.

Reactivi: 1. 1 g roşu coloidal dizolvat în 10 ml alcool 96°. După 24 de ore se decantează stratul clar, care constituie soluţia-mamă. În momentul întrebuinţării se face o diluţie de 0,3 ml soluţie-mamă + 20 ml apă distilată încălzită la 37°.

2. Tampon fosfat pH 7,4.

Tehnica. Într-un tub de hemoliză se amestecă 0,05 ml ser cu 0,05 ml soluţie-tampon pH 7,4, plus 2,5 ml soluţie roşu coloidal. Citirea rezultatelor se face după ce amestecul a stat la întuneric 24 de ore. Reacţia este pozitivă şi se notează cu+++ cînd precipitarea este completă, iar lichidul supernatant este clar.

Reacţia este uşor pozitivă şi se notează cu +, cînd precipitarea este incompletă, iar lichidul supernatant este opalescent.

Reacţia este negativă, cînd amestecul este clar şi se notează cu —. Testul este negativ în afecţiunile extrahepatice şi în toate cazurile normale; pozitivarea lui indică o scleroză a ficatului.

Reacţia Vernes cu rezorcină pune în evidenţă proteinele bogate în zaharuri, ca serummucoidele şi α-globulinele.

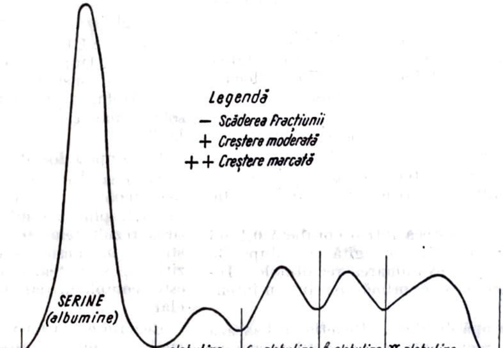
Tehnica. Într-un tub de hemoliză se pune 1 ml ser +1 ml soluţie de rezorcină 1,25%.

Citirea rezultatelor se face imediat sau după 2 ore de la punerea reactivului.

În cazuri normale se observă o uşoară turbiditate a amestecului. În inflamaţii, turbiditatea creşte considerabil de mult pînă la lactescenţă.

Legătura între testele de disproteinemie şi rezultatele obţinute prin electroforeză rămîne încă o problemă de discutat. Acest lucru se datoreşte faptului că testele de disproteinemie nu se adresează unei singure fracţiuni, aşa cum se întîmplă în cazul metodei de electroforeză. Cînd specificăm că un test de disproteinemie se adresează unei anumite fracţiuni ne referim doar la o mai mare specificitate faţă de fracţiunea respectivă, fără ca aceasta să aibă vreo

valoare absolută. De altfel, chiar datele din literatură sînt încă controversate în această problemă. Pentru aceasta, electroforeza rămîne metoda de bază pentru investigarea echilibrului proteic în ser. Legătura relativă care se poate stabili între curba electroforetică şi fiecare test de disporteinemie în parte este schematizată în figura 97.



		SERINE (albumine)	$\alpha_1$globuline	α_2-globuline	β-globuline	γ-globuline
Reacția	Gross	—			+	+ +
”	SO_4Cd			+		+
”	Thymol				+ + (fosfolipide)	+
”	Takata-Ara	—			+	+ +
”	Weltman scurt Cadmiu pozitiv			+ +		
”	Weltman scurt Cadmiu negativ				+ +	
”	Weltman lung Cadmiu pozitiv					+ +
”	Huerga Topper (SO_4NH_4)					+ + +
”	Fornol gel Gaté					+ + (fibrinogen)
”	SO_4Zn(Kunkel)					+ +
”	SO_4Cu					+ +
”	Apă distilată				+	+
”	Cefalin-colesterol					+ +
”	Aur coloidal	—				+
”	Rezorcină (Vernes)			+ +		

Fig. 97. — Legătura între curba electroforetică şi testele de disproteinemie.

INTERVENŢIA FICATULUI ÎN CATABOLISMUL PROTEIC

Aminoacizii, principalele unităţi chimice obţinute din proteinele hranei, prezintă în organism 3 căi metabolice esenţiale:

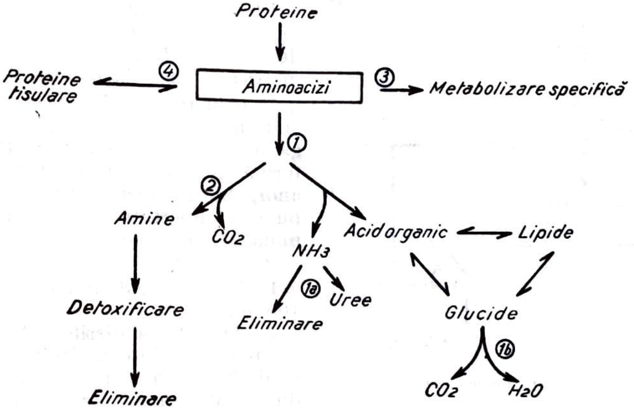

Proteine
Proteine tisulare
④
Aminoacizi
③
Metabolizare specifică
①
②
Amine
CO_2
NH_3
Acid organic
Lipide
Detoxificare
1a
Uree
Eliminare
Glucide
1b
Eliminare
CO_2
H_2O

Fig. 98. — Metabolizarea generală a acizilor aminaţi.

a) degradare, prin pierderea elementelor celor mai mobile din moleculă: NH_2 şi CO_2 (1,2);

b) degradare specială, caracteristică anumitor acizi aminaţi (3);

c) sinteză la proteinele tisulare (4), fenomen dinamic, în funcţie de necesităţile organismului.

Prin pierderea grupării NH_2 — fenomen numit *dezaminare* — iau naştere amoniac şi un acid organic (1). Amoniacul, compus foarte toxic, este eliminat ca atare sau utilizat în sinteza ureei (1 *a*). Acidul organic se poate transforma reversibil în glucide şi lipide sau se metabolizează final la CO_2 şi H_2O (1 *b*).

Prin pierderea grupării CO_2, fenomen numit *decarbonilare*, iau naştere aminele corespunzătoare (2). Aceşti intermediari, fiind toxici, organismul îi neutralizează prin aşa-numita detoxifiere şi îi elimină.

Ficatul joacă un rol esenţial în dezaminarea aminoacizilor. După natura reacţiei chimice distingem următoarele tipuri generale de dezaminări:

a) Dezaminarea oxidativă, care transformă acidul aminat în NH_3 şi un cetoacid: acid aminat → NH_3 + cetoacid.

b) Dezaminarea reductivă, care transformă acidul aminat în NH_3 şi un acid gras: acid aminat → NH_3 + acid gras.

c) Dezaminarea nesaturantă, care transformă acidul aminat în NH_3 şi un acid gras nesaturat: acid aminat → NH_3 + acid gras nesaturat.

d) Dezaminarea hidrolitică, care transformă acidul aminat în NH_3 şi un oxiacid: acid aminat → NH_3 + oxiacid.

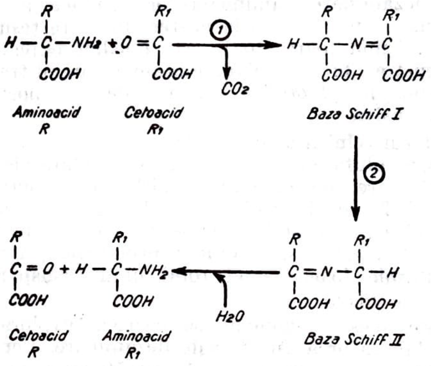

R
$H-C-NH_2 + O=C$
COOH
R_1
COOH
①
CO_2
$H-C-N=C$
R
R_1
COOH COOH
Aminoacid R
Cetoacid R_1
Baza Schiff I
②
$C=O + H-C-NH_2$
R
R_1
COOH
COOH
H_2O
$C=N-C-H$
R
R_1
COOH COOH
Cetoacid R
Aminoacid R_1
Baza Schiff II

Fig. 99. — Mecanismul biochimic al transaminării.

e) Transaminarea — sistem special de dezaminare, prin care gruparea aminică a unui acid aminat este transferată pe un cetoacid. Aminoacidul care donează gruparea NH_2 devine cetoacid, iar cetoacidul care primeşte această grupare devine aminoacid.

Într-o primă ecuaţie (1), aminoacidul se condensează cu cetoacidul, prin eliminare de apă, formînd un compus cu dublă legătură, numit baza Schiff I. Aceasta îşi reorganizează dubla legătură trecînd în baza Schiff II (2), care se hidrolizează ulterior (3) la aminoacid şi cetoacid. Fenomenul este enzimatic şi se face sub influenţa *transaminazei*, a cărei grupare activă o formează vitamina B_6 fosforilată (piridoxal-fosfatul).

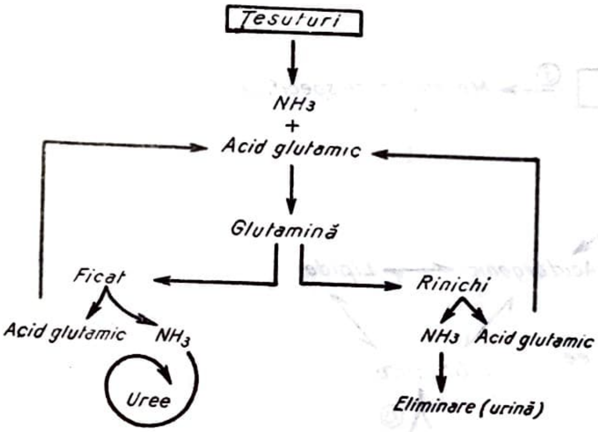


Fig. 100. — Metabolizarea amoniacului.

Dezaminarea aminoacizilor produce în organism amoniac. El ia naştere în toate ţesuturile. Fiind foarte toxic este imediat cuplat la formarea lui cu acidul glutamic, care îl transformă în *glutamină* — formă de transport — inofensivă.

La nivelul ficatului, *glutaminaza hepatică* scindează glutamina, eliberînd acid glutamic şi NH_3 care este introdus în ciclul de formare a ureei. La nivelul rinichiului, glutaminaza renală scindează glutamina, eliberînd acid glutamic şi NH_3, care este eliminat prin urină. Acidul glutamic joacă astfel rolul unui transportor de amoniac.

Pe aceste fenomene se bazează explorarea de laborator a funcţiei de dezaminare. Pentru aprecierea ei se practică următoarele teste:

1. Determinarea de azot.
2. Testul toleranţei la acizi aminaţi.
3. Determinarea transaminazei serice.

În sînge, ser sau plasmă, azotul se găseşte sub formă de proteine sau sub formă de azot neproteic, ca: uree, acid uric, amoniac, acizi aminaţi, polipeptide, creatină, creatinină şi pigmenţi.

Dozarea azotului total

Azotul total conţine toate formele de azot existente în sînge, ser sau plasmă, dozarea putîndu-se face în oricare din acestea. Metodele de dozare cele mai folosite sînt: metoda titrimetrică şi metoda colorimetrică.

Metoda titrimetrică (*microdozare Kjeldahl*). Metoda constă în transformarea azotului organic în azot anorganic (mineralizare), sub formă de sulfat de amoniu. Tratarea azotului anorganic cu alcali, prin antrenarea cu vapori, pune în libertate amoniacul care este determinat titrimetric.

Aparatură.

1) Balon Kjeldahl cu o capacitate de 50—100 ml.

2) Aparat de distilat Parnas-Wagner.

Aparatul este constituit dintr-un balon Kjeldahl (*K*) prevăzut cu o pîlnie prin care se introduce substanţa mineralizată şi hidroxid de sodiu 40%. Amoniacul liber trece prin refrigerator în flaconul care conţine o cantitate cunoscută de acid clorhidric N/70. Antrenarea amoniacului se face cu ajutorul vaporilor formaţi în balonul generator (*g*) de vapori. Recipientul intermediar (*S*) este folosit atît pentru spălarea aparatului, cît şi ca vas de siguranţă pentru a împiedica pătrunderea apei din generator în balonul care conţine proba de analizat.

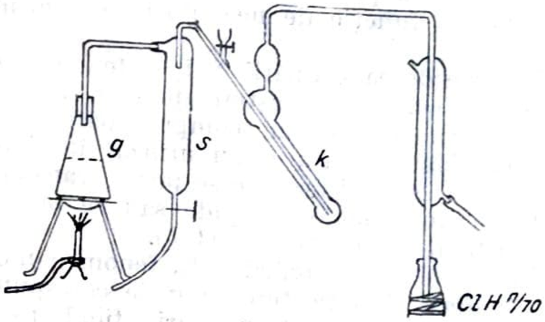


Fig. 101. — Aparatul de distilat Parnas-Wagner.

Reactivi:

1. Soluţie de roşu metil 0,1% în acool 70°.
2. Soluţie de acid sulfuric N/70.
3. Soluţie de hidroxid de sodiu N/70.
4. Soluţie de hidroxid de sodiu 40%.

5. Oxalat de potasiu cristalizat.
6. Acid sulfuric concentrat p.a. (D=1,84).

Tehnica. Mineralizarea se face în prezența oxalatului de potasiu, acesta avînd rol de catalizator. Se introduc într-un balon Kjeldahl: 1 ml sînge, plasmă sau ser + 1 ml acid sulfuric concentrat + 0,5 g oxalat de potasiu. În gîtul balonului Kjeldahl se pune o pîlnie mică și apoi se așază balonul în poziție înclinată (65°), pe o sită metalică, deasupra unei flăcări mici de bec Bunsen. La începutul încălzirii se formează o spumă abundentă, în care timp balonul trebuie supravegheat mereu pentru reglarea flăcării în timpul fierberii. Conținutul balonului se brunifică, apoi începe să se degajeze un fum alb și conținutul se decolorează din ce în ce mai mult. Se continuă fierberea pînă nu se mai degaje fum și decolorarea conținutului este completă. În aceste condiții, substanța organică este distrusă și tot azotul este transformat în sulfat de amoniu. După răcirea balonului Kjeldahl, conținutul cristalizat se reia în 2—3 ml apă distilată, se agită, se încălzește ușor la flacără pentru a se dizolva sulfatul de amoniu și apoi se trece în aparatul de distilat Wagner-Parnas.

Distilarea. Într-un vas Erlenmeyer de 100 ml se măsoară exact 10 ml acid clorhidric N/70 + 2 picături de roșu de metil; vasul este așezat înclinat sub refrigeratorul aparatului, în așa fel încît tubul refrigeratorului să intre 1—2 cm în acid. În balonul de distilat se introduce substanța mineralizată dizolvată în apă distilată. Balonul Kjeldahl este spălat de două-trei ori cu apă distilată și apele de spălare sînt trecute tot în balonul de distilat. În balonul de distilat se mai adaugă 2 picături de fenolftaleină și 6 ml hidroxid de sodiu 40% pentru descompunerea sulfatului de amoniu. Se închide apoi aparatul perfect. Se mărește flacăra becului sub generatorul de vapori, în care se găsește apa acidulată cu 2—3 picături de acid sulfuric concentrat; se distilă 20 de minute, în care timp volumul lichidului din vasul receptor se dublează. Se coboară apoi vasul receptor și se spală cu cîțiva mililitri apă distilată tubul refrigeratorului, se continuă distilarea 2—3 minute, pentru ca tot lichidul rămas pe tubul refrigeratorului să cadă în vasul receptor. Se încălzește la fierbere conținutul vasului receptor și se titrează excesul de acid cu o soluție de hidroxid de sodiu în prezența roșului de metil. Paralel se face o probă-martor, înlocuind serul cu apă distilată.

Calcul: mg azot la 100 ml ser $= n_2 - n_1 \times 0,2 \times 100$, în care:

n_1 = ml NaOH N/70 întrebuințați la titrarea probei;

n_2 = ml NaOH N/70 întrebuințați la titrarea probei martor.

$$\text{Factorul } 0,2 = \frac{\text{greutatea moleculară a azotului}}{\text{normalitate}} = \frac{14}{70} = 0,2$$

Metoda colorimetrică. Metoda constă în transformarea azotului organic în azot anorganic sub formă de sulfat de amoniu. Determinarea cantității de amoniac se face prin colorimetrarea complexului format din amoniac + reactivul Nessler.

Reactivi: 1. Acid sulfuric concentrat.
2. Soluție de hidroxid de sodiu 40 g%.
3. Oxalat de potasiu cristalizat.
4. Reactiv Nessler: 10 g biiodură de mercur (HgI_2) sînt mojarate cu puțină apă, li se adaugă 5 g iodură de potasiu și amestecul este trecut în balon de 100 ml, se adaugă 20 g hidroxid de sodiu dizolvate în 50 ml apă distilată și se completează la 100 ml. Se lasă 2—3 zile amestecul pentru a se depune substanțele insolubile, iar supernatantul se trece într-o sticlă brună, în care se poate conserva timp îndelungat.
5. Soluția-etalon 0,05 mg N/ml: se dizolvă 23,5 mg sulfat de amoniu [$SO_4(NH_4)_2$] în 100 ml apă distilată.
6. Perhidrol 40%.

Tehnica. Mineralizarea se face în balonul Kjeldahl, ca în metoda precedentă. După mineralizare și după răcire se adaugă 2 picături perhidrol și se încălzește balonul din nou pînă la apariția vaporilor albi, continuînd din acest moment încă 30 de secunde, timp în care lichidul a devenit incolor. După răcire se adaugă 10 ml apă distilată + 3 ml soluție hidroxid de sodiu 40% + 0,5 ml reactiv Nessler. Probele de cercetat se colorează în galben închis, iar proba martor în galben deschis. Soluția-etalon de sulfat sau de clorură de amoniu nu se mineralizează, ci li se adaugă numai reactivii.

Calcul: mg N% ml ser =

$$= \frac{\text{înălțimea soluției standard} \times 100 \times \text{concentr. soluției-etalon}}{\text{înălțimea soluției de cercetat}}$$

Intensificarea culorii obținute se poate determina și la Pulfrich cu filtru S_{43}. Curba de referinţă se obţine cu soluţii de concentraţii cunoscute, ca 0,01, 0,03, 0,05, 0,08, 0,1 mg N/ml. Valorile normale pentru azotul total sînt cuprinse între 12 şi 13 g‰.

Dozarea azotului neproteic (azotul acidosolubil şi azotul polipeptidic)

Determinarea azotului neproteic se face după prealabila îndepărtare a proteinelor. Deproteinizarea constă în tratarea serului cu substanţe care precipită proteinele, fără să le hidrolizeze. Acidul tricloracetic în concentraţie de 20% este unul dintre cei mai buni deproteinizanţi. La 2 ml ser se adaugă 2 ml soluţie de acid tricloracetic. După un contact de 20 de minute, amestecul se agită, se filtrează sau se centrifughează. În filtrat sau în supernatant se dozează azotul neproteic după metodele descrise la „Dozarea azotului total".

Valori normale : 25—35 mg % ml ser.

Azotul neproteic este crescut în diferite stări patologice : malarie, atrofie galbenă a ficatului, vărsături, ocluzii intestinale, diaree profuză, ciroze compensate, comă hepatică. Cea mai mare valoare diagnostică o are în bolile de rinichi : nefrite cronice şi acute, cînd cantitatea de azot restant este proporţională cu gravitatea leziunii renale, astfel determinarea are valoare prognostică.

Dozarea azotului neproteic (azotul acido-solubil)

Determinarea azotului acido-solubil se face după o prealabilă deproteinizare a proteinelor. Deproteinizarea constă în tratarea serului cu substanţe care precipită proteinele şi azotul polipeptidic. Deproteinizantul cel mai utilizat în acest scop este wolframatul de sodiu, soluţie 10%. Tehnica de deproteinizare constă în tratarea a 2 ml ser cu 2 ml wolframat de sodiu 10% şi 2 ml acid sulfuric 0,5 N. Amestecul se agită 20 de minute, apoi se centrifughează sau se filtrează. În filtrat sau supernatant se dozează azotul acido-solubil după metodele descrise la „Dozarea azotului total".

Dozarea azotului polipeptidic

Acidul tricloracetic precipită proteinele. Supernatantul conţine azot acidosolubil şi azot polipeptidic.

Wolframatul de sodiu precipită proteinele şi polipeptidele, supernatantul conţine numai azot acidosolubil. Pe supernatantele obţinute se determină azotul (vezi tehnica). Diferenţa dintre cifrele căpătate prin cele două metode de deproteinizare reprezintă azotul polipeptidic. Azotul polipeptidic se mai numeşte „azot dublu" sau „azot diferenţial".

Azotul polipeptidic = azot tricloracetic — azot fosfotungstic.

Rezultate : valori normale = 4—6mg%.

Valori crescute se găsesc în nefrite, uremii, ciroze, ictere grave.

Raportul $\frac{\text{N polipeptidic}}{\text{N tricloracetic}}$ reprezintă aşa-numitul „indice de dezaminare".

El variază între 0,12 şi 0,16 în mod normal şi este crescut în insuficenţe hepatice.

Dozarea azotului rezidual

Azotul rezidual este egal cu diferenţa dintre azotul neproteic şi azotul ureic.

Azotul neproteic se detrmină după metodele descrise mai sus, iar azotul ureic se determină din cantitatea de uree obţinută prin metoda Fosse sau Kowarski. Cifrele de azot obţinute prin metoda Kowarski sînt mai mari decît realitatea, deoarece conţin — în afară de azot ureic — şi o parte din azotul celorlalţi compuşi azotaţi.

Azotul ureic se calculează din cantitatea de uree determinată. Ureea ($CO(NH_2)_2$) are greutatea moleculară 60,08, iar greutatea moleculară a N este 14; în 60,08 g uree se află 28 g N.

în M g uree se află x g N :

x g N (cantitatea de azot ureic) $= \frac{28\ M}{60,08}$.

Azotul rezidual la 1 000 ml ser $= n - x$ în care

n = g azot neproteic ‰ ml ser ;

x = g azot ureic ‰ ml ser.

Valori normale : 10—16 mg%.

Azotul rezidual se prezintă crescut în nefrite cronice şi acute, intoxicaţii cu mercur, tuberculoza renală, hipertrofia prostatei.

Dozarea azotului aminic

Metoda Pope-Stevens se bazează pe dozarea iodometrică a complexului cupric.

Reactivi :1. Clorură de cupru 0,16 M. 27,3 g $CuCl_2 + 2H_2O$ sînt dizolvate în 1 000 ml apă distilată.

2. Reactiv fosfat trisodic. 64,5 g fosfat disodic ($PO_4HNa_2 . 12H_2O$) sînt dizolvate în

500 ml apă distilată recent fiartă. După dizolvare se adaugă 7,2 g hidrat de sodiu şi se completează la 1 000 ml cu apă.

3. Tampon borat. 57,21 g tetraborat de sodiu ($B_4O_7Na_2$ $10H_2O$) se dizolvă în 1 500 ml apă distilată. După dizolvare se adaugă 100 ml acid clorhidric N şi se completează la 2 000 ml.

4. Suspensie de fosfat de cupru. La un volum soluţie de clorură de cupru se adaugă 2 volume soluţie de fosfat trisodic (2), se agită bine şi se adaugă 2 volume tampon borat (3). Această suspensie poate fi utilizată timp de cîteva zile.

5. Timolftaleină 0,1 g se dizolvă în 100 ml alcool etilic 50%.

6. Tiosulfat de sodiu N/100.

7. Acid acetic glacial.

8. Iodură de potasiu.

Tehnica. Într-un balon cotat de 50 ml se pun 5 ml ser + 4 picături timolftaleină, se adaugă hidrat de sodiu N pînă la culoare slabă albastră, apoi 30 ml suspensie fosfat (4), se completează la semn cu apă distilată. Se amestecă prin răsturnare şi se filtrează prin hîrtie de filtru.

La 10 ml filtrat se adaugă 0,5 ml acid acetic concentrat + 1 g iodură de potasiu.

Soluţia este titrată cu o soluţie de tiosulfat de sodiu N/100. Se adaugă 4 picături soluţie de amidon spre sfîrşitul titrării. În practică se fac două probe : la una se adaugă la început amidon, pentru a şti aproximativ pînă unde se titrează, iar la proba a doua amidonul se adaugă aproape de sfîrşitul titrării.

Rezultate : 1 ml soluţie tiosulfat de sodiu N/100 corespunde unui echivalent de 0,28 mg N-aminic. Cantitatea de tiosulfat întrebuinţată este raportată la diluţia efectuată în cursul operaţiei.

Calcul : dacă s-au luat iniţial 5 ml ser şi s-au diluat pînă la 50 ml şi s-a lucrat pe 10 ml filtrat înseamnă că rezultatul obţinut la titrare reprezintă cantitatea în mg de N-aminic/ml de ser cercetat :

mg NH_2% ml ser = $n \times 0{,}28 \times 100$, unde :
n = numărul de ml de tiosulfat N/100.

Metoda Folin. Se bazează pe reacţia de culoare pe care o dau aminoacizii cu reactivul β-naftochinonsulfonat de sodiu în mediu alcalin.

Reactivi : 1. Soluţie proaspătă de 0,5% de β-naftochinonsulfonat de sodiu.

2. Soluţie de carbonat de sodiu : 50 ml soluţie saturată de carbonat de sodiu se diluează la 500 ml şi se titrează cu acid clorhidric N/10 în prezenţa roşului de metil ca indicator. Se diluează astfel ca 8,5 ml din această soluţie să corespundă la 20 ml acid clorhidric N/10.

3. Soluţie de fenolftaleină 1% în alcool 95°.

4. Soluţie de acetat de sodiu — acid acetic : 100 ml acid acetic 50% se diluează cu un volum egal din soluţia de acetat de sodiu 5% — cîntărit la precizie. Soluţia serveşte la intensificarea culorii complexului şi evită apoi apariţia unei tulburări datorită sulfului după adăugarea tiosulfatului.

5. Soluţie de tiosulfat de sodiu 4%.

6. Wolframat de sodiu 10%.

7. Acid sulfuric 2/3 N.

8. Soluţia-etalon de aminoacizi conţine 0,07 mg azot la 1 ml (37,5 g glicocol se dizolvă în 100 ml acid clorhidric N/10. Se adaugă 0,3% benzoat de sodiu pentru conservare îndelungată).

Tehnica. Se efectuează pe sînge total sau pe ser. Într-un balon cotat de 25 ml se măsoară 10 ml filtrat defecat după Folin şi Wu. În alt balon cotat, de acelaşi volum, se măsoară 1 ml soluţie-etalon de acid aminat (5) care conţine 0,07 mg azot (5) şi 9 ml apă. În fiecare balon se adaugă o picătură soluţie fenolftaleină 0,25%. La soluţia etalon se adaugă 1 ml soluţie de carbonat de sodiu pentru neutralizare (2). La soluţia de cercetat se adaugă picătură cu picătură soluţie de carbonat de sodiu (2), pînă ce capătă coloraţia roşcată ca şi soluţia-etalon (5—6 picături sînt suficiente). Se adaugă apoi la fiecare probă 2 ml soluţie proaspătă din soluţia 0,5% de β-naftochinonsulfonat de sodiu. Se agită bine şi se fierb 3 minute în baia de apă. După ce se răcesc sub curent de apă se adaugă în fiecare probă 2 ml amestec de acetat de sodiu acetic (3) şi 2 ml de tiosulfat (4). Se completează pînă la semnul de 25 ml cu apă distilată, se agită şi se compară la fotocolorimetru cu filtru S_{49} şi cuva de 1 cm. Lichidul de compensaţie fiind apa distilată se va ţine seama de diluţia efectuată.

Metoda Moore-Stein. Se bazează pe reacţia de culoare pe care o dau aninoacizii cu ninhidrina. Aminoacizii, în prezenţa ninhidrinei dau o coloraţie roşie-violetă, a cărei intensitate este proporţională cu cantitatea de aminoacizi totali.

Reactivi : 1. Ninhidrina pură se prezintă sub formă de cristale de culoare galbenă pai şi are proprietatea de a se dizolva perfect în apă la cald. În caz contrar, ninhidrina se purifică,

2. Acid ascorbic.

3. Etilenglicolmonometileter sau metilcelosolv metilglicol.

4. Tampon acetat de sodiu pH 5,5. În 40 ml apă distilată se dizolvă la fierbere 54 g acetat de sodiu cristalizat cu $3H_2O$. Soluția răcită încet la temperatura laboratorului este trecută într-o fiolă gradată de 100 ml și tratată cu 10 ml acid acetic glacial. Se aduce la semn cu apă distilată, se concentrează în caz de nevoie cu hidrat de sodiu 20% și se păstrează la + 4° fără conservant timp îndelungat.

5. Diluent etanol-apă : V/V.

6. Hidrantină. În 200 ml apă distilată încălzită la 90° se dizolvă 8 g ninhidrină. În 40 ml apă distilată încălzită la 40° se dizolvă 8 g acid ascorbic. În soluția de ninhidrină se adaugă prin agitare soluția de acid ascorbic. Imediat se formează cristale de hidrantină care se lasă în repaus 30 de minute, la temperatura laboratorului pentru o cristalizare completă. Se filtrează la trompă, se spală cristalele cu apă distilată și se usucă în vid pe clorură de calciu. Randament 75%. Hidrantina se conservă în vase închise ferite de lumină.

7. Reactivul ninhidrină-hidrantină. Se dizolvă 0,03 g hidrantină și 0,2 g ninhidrină în 7,5 ml metilcelosolv. După dizolvare se adaugă soluției de hidrantină-ninhidrină 2,5 ml tampon pH 5,5, aducîndu-se astfel volumul la 10 ml. Reactivul se conservă numai 24—48 de ore în sticle închise. Se recomandă a se prepara reactivul în momentul întrebuințării.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 1 ml ser + 3 ml acetonă. Se agită, se centrifughează, iar din supernatant se ia 1 ml care se tratează cu 1 ml reactiv hidrantină-ninhidrină. Proba martor se lucrează la fel ca proba de cercetat, înlocuindu-se 1 ml de supernatant cu 1 ml ser fiziologic. Se fierb 5 minute la baie de apă proba și martorul. Se adaugă în fiecare tub 1 ml diluent, se agită și se citește la fotocolorimetru cu filtru S_{57}, cuva de 1 cm.

Extincția citită se raportează la curba de etalonare construită cu diluțiile corespunzătoare de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, și 18 mg $N\text{-}NH_2\%$, efectuate din soluția standard de leucină, 20 mg $N\text{-}NH_2\%$ ml. Probele pentru etalonare sînt lucrate în aceleași condiții ca și proba de cercetat.

Rezultate : valori normale 4 — 8 mg$N\text{-}NH_2\%$ ml.

Valori crescute : în atrofia galbenă acută și în alte afecțiuni degenerative ale ficatului, eclampsie și leucemia mieloidă.

Teste de toleranță la aminoacizi

Ficatul fiind organul de dezaminare a aminoacizilor în cazul unei afecțiuni hepatice nu va putea dezamina în totalitate aminoacizii care în acest caz se vor găsi în cantități mai mari în sînge și urină. Pe acest fapt se bazează testele de toleranță la aminoacizi care constau în administrarea de aminoacizi (glicocol, tirozină, fenilalanină, cistină, leucină, metionină) sau gelatină, urmată de dozarea aminoacizilor în sînge sau urină. Testele nu au însă o valoare sigură în aprecierea funcțională a ficatului, deoarece rezultatele lor nu corespund stării clinice decît în cazuri de afecțiuni grave hepatice. Aceasta se datorește faptului că ficatul posedă rezerve funcționale atît de mari, încît tulburarea dezaminării acizilor aminați nu se produce decît în stadiile înaintate, finale, ale insuficienței hepatice.

Proba cu metionină constituie însă un test mai valoros decît testele cu alți aminoacizi. Testul constă în administrarea *per os* (a 10 g metionină/kilocorp la adulți și 0,2 g/kilocorp la copii) și în determinarea fotometrică a cantității de metionină eliminată prin urină în 24 de ore.

În mod normal se elimină 13% din cantitatea administrată la adult și copii. O eliminare peste 19% la adult și 15% la copii indică o leziune hepatică difuză.

Testul este bun pentru stabilirea alterării difuze hepatice în stadiile înaintate ale hepatitelor sau cirozelor. Testul nu poate fi folosit pentru detectarea unor alterări funcționale precoce, pentru urmărirea evoluției unei afecțiuni hepatice sau pentru diagnosticul diferențial al unui icter.

Proba cu gelatină constă în excluderea proteinelor din alimentația bolnavului cu 2—3 zile înainte și colectarea urinii din ultima zi. În dimineața probei se administrează 50 g gelatină dizolvată în 500 ml apă și apoi se recoltează 4 prize de urină la interval de 4 ore fiecare. În toate cele 4 porțiuni de urină, precum și în urina din ziua dinainte de probă se dozează azotul aminic și se notează cantitatea totală eliminată, precum și concentrația urinară a aminoacizilor. În afecțiunile hepatice difuze, amîndouă aceste valori sînt crescute.

SINTEZA UREEI

Este unul dintre fenomenele de detoxifiere esențiale pentru organism, în care ficatul joacă rolul principal. Înglobarea amoniacului în uree se face cu ajutorul a 3 acizi aminați : ornitină, arginină și citrulină, intervenind secundar pe ciclu, acidul glutamic și aspartic.

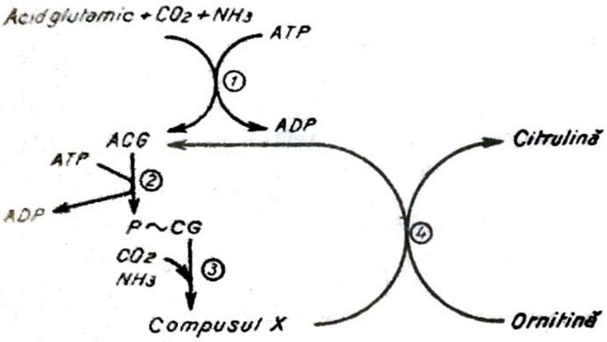


Fig. 102. — Transformarea ornitinei în citrulină.

Într-o primă etapă, acidul glutamic cuplează o moleculă de NH_3 și CO_2, trecînd în acid carbamil-glutamic (ACG). Reacția necesită consum de energie, fiind cuplată cu desfacerea unei molecule de ATP (1). ACG se fosforilează cu o nouă moleculă de ATP, dînd fosfatul carbamil-glutamic (P~CG) (2). Acesta captează o nouă moleculă de NH_3 și CO_2, dînd un compus de structură necunoscută, dicarbamil-glutamicul sau compusul X (3). El este acela care cedează o grupare carbamil-ornitinei, transformînd-o în citrulină (4) și refăcînd acidul carbamil-glutamic.

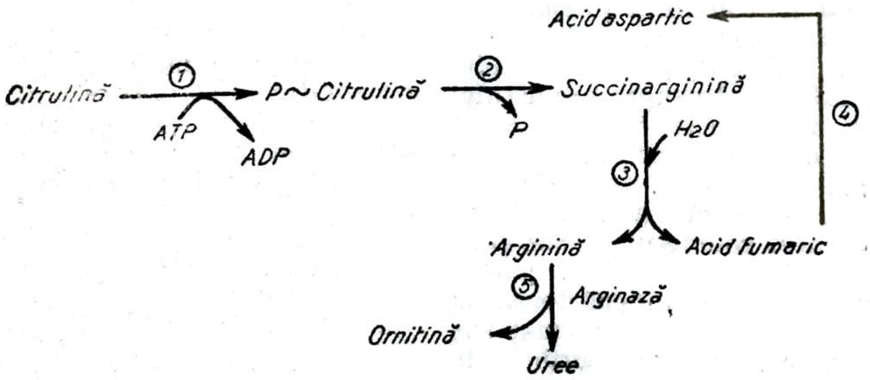


Fig. 103. — Transformarea citrulinei în arginină.

Citrulina se fosforilează și ea, consumînd o moleculă de ATP (1). Fosfatul de citrulină se condensează cu acid aspartic, elimină fosforul și formează succino-arginina (2). Aceasta se hidrolizează în arginină și acid fumaric (3) care în ciclul Krebs—printr-o transaminare ulterioară — reface acidul aspartic (4). Arginina, sub influența *arginazei hepatice*, eliberează uree și ornitină, care reia ciclul de la început (5).

Acest important fenomen stă la baza explorării de laborator, a funcției ureogentice. Ea se face prin determinarea N ureic sau prin testele dinamice ale raporturilor de azot (vezi mai sus).

Dozarea ureei în ser

Metoda Kowarski. Ureea ($O = C = (NH_2)_2$) este descompusă cu ajutorul unei soluții alcaline de hipobromit de sodiu în N, CO_2 și H_2O.

CO_2 este adsorbit de hidroxidul de sodiu, care este în exces, iar volumul azotului degajat se măsoară volumetric.

Reactivi : 1. Soluție saturată de clorură de sodiu și sulfat de potasiu : sulfat de potasiu 150 g, clorură de sodiu 350 g și apă distilată 1 000 ml.

2. Hidroxid de sodiu 33%.
3. Brom.
4. Acid tricloracetic 20%.

Aparatura. Dozarea se face în ureometrul Kowarski. Aparatul se compune dintr-un tub în formă de U, care este divizat în trei părți prin 2 robinete, cel de deasupra avînd 2 căi, iar cel de dedesubt 3 căi. Sub robinetul superior, tubul subțire are o capacitate de 1 ml și este divizat în fracțiuni de 0,2 ml. Mai jos, tubul se lărgește și este divizat în zecimi de ml. Același ordin de diviziuni este făcut și deasupra robinetului în tubul receptor. Robinetul cu 3 căi are un tub de scurgere lateral, astfel încît cu ajutorul lui se poate lăsa să curgă afară lichidul din tubul stîng sau drept al ureometrului sau să se asigure comunicația între cele două tuburi.

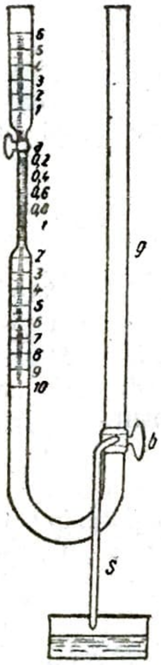


Fig. 104. — Aparatul Kowarski.

Tehnica. Se măsoară 2,5 ml ser sau sînge într-o eprubetă. Datorită marii sale puteri de difuziune, ureea este repartizată egal între plasmă și globule. Se adaugă 2,5 ml acid tricloracetic 20%. Se agită amestecul și se filtrează printr-un filtru mic cu diametrul de 3–4 cm sau se centrifughează. Se umple ureometrul cu reactiv 1, soluție saturată de clorură de sodiu și sulfat de potasiu. Se deschide întîi robinetul de sus, iar cel de jos se așază astfel încît punctul negru să fie în spre spate, cele două brațe să fie în comunicație, iar tubul de scurgere să fie izolat. Se toarnă reactiv 1 prin brațul *a* pînă trece peste robinetul de sus. Se închide acest robinet și se așază robinetul de jos — cu trei căi — așa ca punctul negru să fie în sus. În acest fel comunică brațul *a* cu tubul de scurgere și se formează astfel aici o presiune negativă. Se îndepărtează lichidul rămas din tubul gradat de deasupra robinetului de sus, cu ajutorul unei pipete. Se spală acest tub cu puțină apă distilată, care se îndepărtează tot cu pipeta. Se toarnă apoi filtratul tricloracetic și se notează nivelul lichidului. Se deschide încet robinetul de sus și se lasă să curgă exact 2,5 ml filtrat în partea inferioară a tubului stîng. Se îndepărtează cu pipeta restul de filtrat, se spală ca mai sus cu apă distilată pentru a îndepărta urmele de filtrat și se îndepărtează apa cu pipeta, se repetă spălarea. Într-un cilindru gradat se prepară soluția de hipobromit. La 6 ml hidroxid de sodiu 33% se adaugă 12 picături de brom cu ajutorul unui picător. Se agită ușor amestecul. Această soluție de hipobromit de sodiu se varsă acum în partea de sus a brațului stîng *a*. Se deschide robinetul și se lasă să se scurgă 5–6 ml reactiv (cantitatea depinde de conținutul în uree). Gazul care se dezvoltă împinge soluția de sulfat de potasiu și clorură de sodiu care se scurge prin tubul *d*. Se așteaptă 10 minute pînă ce s-a terminat degajarea de gaz și pînă cînd azotul degajat a avut timp să ia temperatura camerei. Dacă prin lichid sînt răspîndite bule de gaze care nu se strîng la un loc cu volumul de gaz principal, se scoate aparatul de pe suport, avînd robinetele perfect închise și se răstoarnă încet pentru a permite bulelor să se ridice la suprafață.

Pentru a se citi volumul de azot care s-a produs în tub, se procedează în modul următor: se întoarce robinetul astfel ca punctul negru să fie iar în spate, cele două brațe comunicînd între ele. Deoarece gazul trebuie măsurat la presiunea atmosferică se toarnă în tubul *b* soluție Kowarski pînă sus. În acest mod lăsăm lichidul din brațul drept *b* să se scurgă prin *d*, pînă se stabilește același nivel ca în brațul stîng *a*. Se notează exact cantitatea de gaz degajat, adică volumul de gaz din tubul *a*.

Rezultate. Se caută în tabel cifra care corespunde temperaturii și presiunii barometrice din timpul determinării. Cu această cifră se multiplică cifra găsită la dozare.

În lipsa barometrului se înmulțește de obicei volumul de gaz citit cu factorul 2. Dacă s-a lucrat cu 5 ml filtrat tricloracetic în loc de 2,5 ml factorul se împarte cu 2, iar dacă s-a lucrat cu 1,25 ml filtrat tricloracetic, factorul se înmulțește cu 2.

Pentru controlul aparatului și al reactivilor se face o probă-martor, lucrînd cu o cantitate de soluție a cărei concentrație în uree este cunoscută. Dacă la n diviziuni de azot degajat corespunde cantitatea de uree cunoscută, atunci la n' diviziuni ale probei de cercetat corespunde x' g uree,

n . . . . g uree

n' . . . . . x'g uree

$$x' = \frac{n' \cdot \text{g uree}}{n} = \text{g uree la 1 000 ml.}$$

Cu metoda Kowarski, cantitatea de uree la normali este de 0,20–0,50 g la 1 000 ml ser.

Observații. În loc de a se prepara extemporaneu soluția de hipobromit din brom și hidroxid de sodiu se va utiliza următoarea formulă care evită manipularea frecventă a bromului și este mai economică:

Soluția A:

bromură de potasiu 8 g
brom 16 g
apă distilată 320 ml.

Soluția B: hidroxid de sodiu 20%.

Soluția A se conservă la frigider. La întrebuințare se amestecă în părți egale soluție A + soluție B.

TABELUL 53

Determinarea ureei după Kowarski

Barometrul	10°	12°	14°	16°	18°	20°	22°	24°	25°
710	1,91	1,90	1,88	1,86	1,84	1,83	1,81	1,80	1,79
720	1,94	1,92	1,91	1,89	1,87	1,85	1,84	1,82	1,80
725	1,95	1,93	1,92	1,90	1,89	1,87	1,85	1,83	1,82
730	1,97	1,94	1,93	1,91	1,90	1,88	1,87	1,85	1,83
735	1,98	1,96	1,94	1,93	1,91	1,89	1,88	1,86	1,84
740	1,99	1,97	1,96	1,94	1,92	1,90	1,89	1,87	1,86
745	2,01	1,99	1,98	1,96	1,94	1,92	1,91	1,89	1,87
750	2,02	2,00	1,99	1,97	1,95	1,93	1,92	1,90	1,88
755	2,04	2,02	2,00	1,98	1,96	1,95	1,93	1,92	1,90
760	2,05	2,03	2,01	2,00	1,98	1,96	1,95	1,93	1,91
765	2,06	2,05	2,03	2,01	1,99	1,97	1,96	1,94	1,92
770	2,08	2,06	2,04	2,02	2,00	1,98	1,97	1,95	1,93

Spălarea aparatului. După dozare se scurge lichidul în brațul stîng, deschizînd robinetul superior și se așază robinetul inferior cu punctul negru în jos. Cînd lichidul este îndepărtat se spală de cîteva ori cu apă. Aparatul trebuie golit imediat, bine spălat, căci altfel se fixează dopurile și nu se mai desfac.

Valorile normale cu această metodă sînt cuprinse între 10 și 50 g ‰ ml ser.

Metoda cu urează. Sub acțiunea ureazei, ureea se descompune cantitativ în amoniac și bioxid de carbon. Amoniacul dă o colorație albastră cu fenolatul de sodiu în prezența hipocloritului de sodiu, formînd indofenoli. Intensitatea de culoare este proporțională cu concentrația.

Reactivi: 1. Apă redistilată lipsită de amoniac: la 2 litri apă distilată se adaugă 1,2 ml soluție $KMnO_4$ 1% și 0,25 ml H_2SO_4 4 N. Se redistilă într-o instalație de sticlă neutră.

2. Reactiv fenolic: 50 g fenol cristalizat p.a. se dizolvă în 800 ml apă redistilată (1). Se adaugă apoi 0,25 g nitroprusiat de sodiu și se aduce la 1 000 ml cu apă redistilată (1). Reactivul se conservă circa 1 lună în sticlă brună, la frigider.

3. Reactiv hipoclorit în mediu alcalin: 25 g hidroxid de sodiu p.a. se dizolvă în 800 ml apă redistilată (1). După răcire se adaugă 2,2 g hipoclorit de sodiu 100%. Se aduce la 1 000 ml cu apă redistilată (1). Dozarea lui se face iodometric: la 1 ml hipoclorit de sodiu diluat în 20 ml apă se adaugă 1—2 g iodură de potasiu și 1 ml acid clorhidric concentrat. Apoi se titrează cu tiosulfat de sodiu 0,1 N în prezența amidonului ca indicator:

$$\text{g NaOCl la 100 ml} = \frac{a \times F_{S_2O_3Na_2} \times 74,5 \times 5}{153,1},$$

a = număr ml $Na_1 S_2O_3$ 0,1 N folosiți la titrare.

4. Tampon fosfați: 0,6 g fosfat monopotasic și 0,2 g fosfat disodic se dizolvă la 100 ml apă redistilată (1).

5. Tampon urează: 0,2 g urează se suspendă în 99 ml apă redistilată (1), la care se adaugă 1 ml soluție-tampon fosfat. Se agită, iar apoi se filtrează. Soluția de urează se păstrează 2—3 zile la frigider.

6. Soluție de uree: 0,5 g uree chimic pură se dizolvă la 100 ml apă redistilată (1).

7. Soluție de sulfat de amoniu: 1,1012 g sulfat de amoniu chimic pur se dizolvă la 100 ml apă redistilată (1). (Soluția este echivalentă cu o soluție de 0,5% uree).

Tehnica. Serul sau plasma se diluează 1 : 100 cu apă distilată. Într-o eprubetă se măsoară 1 ml din diluția 1%, la care se adaugă 1 ml soluție-tampon urează. Martorul conține 1 ml apă distilată (cu care s-a făcut diluția serului) + 1 ml soluție-tampon urează.

Se poate lucra și cu 0,01 ml ser sau plasmă, folosind o pipetă cu scurgere totală de 0,01 ml. În acest caz, martorul conține numai 1 ml soluție-tampon urează.

Eprubetele sînt lăsate la 37° pentru 10 minute și apoi se răcesc la curent de apă. Se adaugă 1 ml reactiv fenolic și imediat 1 ml reactiv hipoclorit, în mediu alcalin. Se agită energic conținutul eprubetelor, care sînt lăsate la întuneric 30 de minute. Se completează volumul la 20 ml cu apă redistilată. Se agită iar. Colorația formată este stabilă 24 de ore. Se colorimetrează la Pulfrich IOR filtru S_{61} în cuva de 2 cm.

După ce se scade martorul din valoarea probei, rezultatul se extrapolează pe curba-etalon care se construiește astfel: din soluția de uree 0,5 g% se ia 1 ml care se aduce la 100 ml cu apă redistilată (1). Din această soluție se fac următoarele diluții : 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 și 1,00 ml, se completează cu apă redistilată la 1 ml. Se adaugă 1 ml soluție-tampon urează. Incubarea și dezvoltarea culorii se fac identic ca la proba de determinat. Martorul conține 1 ml apă cu care s-au făcut diluții și 1 ml soluție-tampon urează.

Din soluția de sulfat de amoniu 1,1012 g se face o diluție de 1 ml la 100. Din această soluție se iau 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 și 1,00 ml, care se completează la 1 ml.În această soluție se dezvoltă culoarea ca mai sus.

Cele două drepte, a ureei și a sulfatului de amoniu, trebuie să se suprapună.

Diluțiile de mai sus corespund următoarelor concentrații : 0,25 ; 0,50 ; 0,75 ; 1,00 ; 2,00 ; 3,00 ; 4,00 și 5,00 g‰ uree.

Valori normale : 0,20—0,60 g‰ uree.

Observații : amoniacul preexistent în sînge dă o creștere neglijabilă (eroare sub 0,5%).

Precauțiile care se iau : în încăperea unde se lucrează să nu existe atmosferă de amoniac de la sticle de amoniac destupate, urini, flacără de gaz, fum de țigară.

Cînd se face un reactiv nou, se face un martor. Valoarea lui nu trebuie să depășească 0,45 unități extincție în cuva de 2 cm.

Metoda cu xantidrol (metoda Fosse) constă în precipitarea cantitativă și specifică a ureei cu xantidrol în mediu de acid acetic, sub formă de dixantiluree.

Greutatea moleculară a dixantilureei este de 7 ori mai mare decît a ureei.

Reactivul Fosse permite precipitarea cantitativă a ureei cu excluderea altor corpi azotoși : amide, ureide, guanide.

Reactivi : 1. Reactiv Tanret :
clorură mercurică, 2,71 g ;
iodură de potasiu, 7,2 g ;
acid acetic glacial, 66 ml ;
apă distilată *ad*, 100 ml.

2. Soluție xantidrol 10% în alcool metilic. În cazul cînd xantidrolul nu se dizolvă bine, se acidifică soluția cu 5 ml acid acetic glacial.

Tehnica. Într-un tub de centrifugă se măsoară volume egale de ser și reactiv Tanret, de exemplu, cîte 1 ml. Se centrifughează și se pipetează lichidul limpede care se pune într-un flacon mic și se notează numărul de mililitri luați. Se adaugă un număr egal de mililitri de acid acetic și cu încetul cîte 0,2 ml de xantidrol 10% de fiecare mililitru. Se agită cu o baghetă și se lasă o oră în repaus, acoperind cu o sticlă de ceasornic. După acest timp se filtrează la trompa de apă pe un filtru tăiat rotund ca sticla de ceasornic care se udă cu puțină apă distilată. Este bine ca filtrarea să se facă concentric, pentru ca precipitatul să nu se întindă prea mult, ceea ce ar îngreuia detașarea. Se spală precipitatul cu alcool metilic pur și se întrerupe contactul cu trompa. Filtrul se pune la etuvă la 100° pe o sticlă de ceasornic. După uscare se detașează discul mic de precipitat și se cîntărește.

Calcul : g uree ‰ ml $= \frac{P}{7} \times \frac{100}{n}$, în care :

P = greutatea discului de dixantiluree;

n = numărul de ml de ser utilizat.

Valori normale după metoda Fosse : 0,1—0,40 g‰ ml ser.

Dozarea ureei cu diacetilmonoximă. Ureea în prezența diacetilmonoximei în mediu acid la cald dă o colorație galbenă care poate fi colorimetrată la fotometrul Pulfrich sau la spectrofotometru.

Metoda fotocolorimetrică. Reactivi.

1. Acid tricloracetic 20%.

2. Diacetilmonoximă 1 g dizolvat în 100 ml acid acetic 5%.

3. Amestec oxidant : 10 g acid arsenic dizolvat în 100 ml apă. După dizolvare se adaugă 50 ml acid sulfuric concentrat.

4. Soluția stoc de uree 1 g‰. Ureea se dizolvă în apă distilată, iar soluția se conservă sub toluol la +4°, timp îndelungat. Soluția 0,1 g uree ‰ se obține în momentul întrebuințării, diluînd soluția stoc 1/10.

Tehnica. Într-un tub de centrifugă se măsoară : 1,4 ml apă distilată; 0,1 ml sînge, ser sau plasmă; 0,5 ml acid tricloracetic 20%. Amestecul se agită, iar după 10 minute se centrifughează. Din supernatant se ia 1 ml care corespunde la 0,05 ml sînge, ser sau plasmă și se tratează cu 0,5 ml reactiv diacetilmonoximă +1,5 ml amestec oxidant. Amestecul se agită și se fierbe în baia de apă, timp de 30 de minute. Intensitatea culorii apărute se citește la fotocolorimetru cu filtru albastru S_{46}, cuva de 1 cm.

Extincția probei se raportează la curba de etalonare construită cu diluțiile obținute din soluția de uree, 0,1 g‰. Diluțiile întrebuințate sînt date în tabelul următor :

	Uree g$^0/_{00}$				
	Proba în alb	0,1	0,2	0,3	0,4
Apă distilată	1	0,9	0,8	0,7	0,6
Soluție de uree	0	0,1	0,2	0,3	0,4
Acid tricloracetic	0	0	0	0	0
Diacetilmonoximă	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Amestec oxidant	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Diluțiile tratate cu reactiv și amestec oxidant sînt fierte în baie de apă, timp de 30 de minute, și apoi fotocolorimetrate cu filtru S_{46}.

Cu extincțiile citite la fotocolorimetru și concentrațiile cunoscute se obține o curbă liniară.

În comparație cu metoda Kowarski, rezultatele obținute sînt mai mici.

Valori normale: 10—40 g$^0/_{00}$ ml ser.

Metoda spectrofotometrică. Reactivii sînt identici cu cei de la metoda colorimetrică, numai defecantul tricloracetic este înlocuit cu un amestec de sulfat de zinc 5 g% și hidroxid de bariu 4,5 g%.

Tehnica. Într-un tub de centrifugă se măsoară: 1 ml sînge; 15 ml apă distilată; 2 ml soluție hidroxid de Ba 4,5 g%; 2 ml soluție sulfat de zinc 5 g%.

Amestecul se agită, iar după 10 minute se centrifughează. Din supernatant se ia 1 ml care corespunde la 0,05 ml sînge și se continuă tehnica fotocolorimetrică.

Aparatul se reglează la 475 mμ cu proba în alb și cuva de 1 cm. Absorbția soluției de cercetat trebuie determinată în interval de 7 minute de la ultima operație. Absorbția este proporțională cu concentrația și se determină din curba-etalon construită din soluții standard de uree.

Valori crescute: în bolile de rinichi, nefrite acute și cronice, azotemii de origine extrarenală, ciroze decompensate, comă hepatică, comă posthemoragică.

Valori scăzute: în nefroze lipoidice, insuficiențe hepatice acute, ciroze compensate.

Se mai descriu și următoarele modalități fiziopatologice:

— Aport sau producere excesivă de uree. Alimentație foarte abundentă cu proteine, autodigestie tisulară, distrugeri tisulare masive, hemoragii interne (în cavități sau țesuturi), perforații intestinale (creșterea bruscă a ureei are oarecare valoare de diagnostic).

— Tulburări în eliminarea ureei. Prin lipsă de apă (ingerare insuficientă, vărsături, diaree etc.), tulburări umorale (cloropenie în special), fără sau cu sindrom urinar secundar, tulburări circulatorii (rinichi de stază), leziuni organice renale (de obicei cu sindrom urinar), obstrucții mecanice ale căilor urinare etc.

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A FUNCȚIEI DE DETOXIFIERE (CONJUGARE)

Ficatul intervine în detoxifierea produșilor intermediari ai metabolismului proteic, care pot avea efecte farmacodinamice dăunătoare, ca și în neutralizarea proteinelor străine (funcția proteopexică). Mecanismele biochimice sînt multiple și nu întru totul elucidate. Aminele toxice pot fi oxidate prin *aminooxidaza hepatică* sau ciclizate în compuși inofensivi. O serie de componente nocive sînt cuplate cu acidul sulfuric sau glucuronic și inactivate (fenomenul de sulfo- și glucurono-conjugare); altele sînt neutralizate cu ajutorul acizilor aminați, de exemplu, acidul benzoic este detoxifiat în acid hipuric și glicocol.

Explorarea biochimică a funcției de detoxifiere proteică se face în mod curent prin următoarele probe:

1. Proba Millon.
2. Proba cu testazid.
3. Proba cu acid hipuric.

Proba Millon. Tirozina nemetabolizată de ficatul lezat este pusă în evidență în urină cu reactivul Millon, care reacționează cu gruparea oxifenolică a tirozinei, dînd o colorație roșie.

Reactivul Millon. 75 g sulfat de mercur sînt dizolvate în 500 ml acid sulfuric diluat (83 ml acid sulfuric concentrat + 417 ml apă), iar în caz că dizolvarea nu este completă, amestecul se încălzește în baia de apă.

Tehnica. La un volum de urină se adaugă 1 volum reactiv Millon, iar amestecul se încălzește pînă la fierbere. În prezența derivaților oxifenolci apare în cursul încălzirii un precipitat de culoare roșie. După răcire se adaugă 1—2 picături nitrit de sodiu 2%. Culoarea roșie se intensifică.

Interpretare. Proba este pozitivă numai în caz de leziuni grave ale parenchimului hepatic și servește la diagnosticul diferențial dintre un icter parenchimatos și unul mecanic.

Reacția nu este specifică, deoarece corpii fenolici proveniți din alimentație sau din putrefacția intestinală dau de asemenea o reacție Millon pozitivă.

Proba cu testacid. α-Tirozina este dezaminată în țesutul hepatic și renal în acid p-oxifenolpiruvic, iar acesta suferă o metabolizare numai la nivelul ficatului în prezența unui complex enzimatic, tirozinoxidaza II, cu producere de acid acetil acetic și de acid piruvic. Metoda se întemeiază pe administrarea bucală a acidului p-oxifenolpiruvic și urmărirea în urină a excreției și implicit a metabolizării sale.

Recoltarea urinii. Cu 24 de ore înainte și în timpul probei, bolnavul nu trebuie să mănînce alimente ca brînză sau alte proteine animale bogate în tirozine. În ziua probei, la 8 dimineața, bolnavului i se dă pe cale bucală 2 g acid oxifenolpiruvic (testacid) în 100 ml apă. În mod normal, acidul degradat este eliminat în 24 de ore. În caz că acidul nu s-a eliminat în prima zi, urina bolnavului se urmărește a doua și a treia zi.

Capacitatea funcțională a ficatului este scăzută, atunci cînd din cantitatea de 2 g acid p-oxifenolpiruvic administrat apar în urină numai 160 mg. Proba este utilizată pentru diagnosticul precoce al cirozei hepatice, este însă lipsită de valoare pentru diagnosticul diferențial dintre icterul mecanic și cel parenchimatos.

Determinarea acidului p-oxifenolpiruvic se face cu *metoda Felix și Teska.*

Extincția colorației roșii, produsă de gruparea oxifenilinei cu reactivul Millon, se citește pe curba etalon.

Reactivi : 1. Reactivul Millon.

2. Soluția de nitrat de sodiu 2%.

3. Acid sulfuric 2 N (28 ml acid sulfuric concentrat + 472 ml apă distilată).

Tehnica. În 2 tuburi de centrifugă, 1 și 2, se pun în fiecare tub 2,5 ml urină + 2 ml reactiv Millon. Se lasă să stea o oră, se centrifughează, supernatantele clare sînt trecute în balonașe de sticlă cu aceeași notație. Depozitul din tuburile de centrifugă sînt spălate cu puțină apă, din nou centrifugate, iar apele de spălare se adaugă supernatantelor din balonașe. Supernatantele sînt acidulate cu 10 ml acid sulfuric 2 N și ținute 15 minute în baia de apă clocotită. După răcire se adaugă din nou în fiecare balonaș 10 ml acid sulfuric 2 N și se lasă în repaus 1/2 de oră. Supernatantele astfel preparate sînt trecute în balonașe cotate de 50 ml. Se adaugă 1 ml soluție de nitrat de Na 2% numai în proba 1, cealaltă servind ca martor; ambele probe se completează cu apă pînă la 50 ml și se filtrează. Intensitatea de culoare se determină fotometric cu filtru S_{50}, cuva de 1 cm. Citirea se face în maximum 1/2 de oră.

Proba cu acid hipuric. Ficatul are rolul, pe de o parte, de a forma glicocolul din degradarea proteinelor, pe de altă parte, de a conjuga glicocolul cu acidul benzoic, sintetizînd astfel acidul hipuric.

Bazîndu-se pe acest proces, metoda urmărește cantitativ eliminarea de acid hipuric în urină în urma administrării orale de acid benzoic.

Această probă aduce date asupra metabolismului protidic al ficatului și asupra funcției antitoxice a acestuia.

Recoltarea urinii. La ora 8 dimineața, pe nemîncate și după golirea vezicii, se administrează 5,9 g benzoat de sodiu dizolvat în 100 ml apă. Se recoltează urina din următoarele 4 ore, se măsoară și se notează volumul și apoi se determină fie volumetric, fie gravimetric cantitatea de acid hipuric eliminat.

Metoda volumetrică se bazează pe titrarea acidului hipuric cu NaOH.

Reactivi : 1. Acid sulfuric 25%.

2. Eter.

3. Hidroxid de sodiu N/10.

4. Fenolftaleină 1% în alcool 96°.

Tehnica. 20 ml urină se acidulează cu 1 ml acid sulfuric și se supune timp de 3 ore extracției cu eter în aparatul Soxhlet. Eterul se evaporă la cald și apar cristale de acid hipuric. Cristalele sînt spălate cu eter de petrol și filtrate printr-un filtru de sticlă. Acidul hipuric este dizolvat în 10 ml apă fierbinte și se titreazic cu hidroxid de sodiu în prezența fenolftaleineă ca indicator.

Calcul: g acid hipuric la volumul de urină = $n \times 0{,}0179 \times v$, unde :

n = numărul de ml de hidroxid de sodiu; 1 ml hidroxid de sodiu N/10 = 0,0179 g acid hipuric;

v = volumul de urină.

Metoda gravimetrică. Urina recoltată se acidifică cu acid acetic și se concentrează prin fierbere. Se adaugă apoi acid clorhidric, agitînd continuu, pînă cînd urina devine acidă la hîrtia de Congo (culoarea albastră). Se continuă amestecarea, frecînd pereții cu bagheta de sticlă încă 3—4 minute, apoi se lasă în repaus o oră la temperatura laboratorului. Se filtrează precipitatul alb de acid hipuric printr-o pîlnie Buchner, prevăzută cu o hîrtie de filtru tarată, apoi se usucă la termostat sau chiar la aer, lăsînd pîlnia acoperită cu o hîrtie de filtru pînă a doua zi. Se cîntăreste și se obține greutatea acidului hipuric prin diferența dintre cele două cîntăriri.

Un individ normal elimină 4—4,5 g acid hipuric în 4 ore. Valorile sub 3,5 g acid hipuric eliminat în 4 ore sînt considerate patologice, exprimînd o insuficiență hepatică, în absența unor leziuni renale.

Se mai pot întrebuința pentru explorarea acestei funcții și testele următoare: proba cu prontozil, proba cu roșu bengal, proba cu azorubin S, proba cu fucsină S.

Proba cu prontosil. Se injectează intravenos 4 ml soluție 5% prontosil. Concentrația colorantului se urmărește după 10 minute și 4 ore în bilă și urină. În afecțiunile hepatice se constată o întîrziere și o scădere pînă la dispariție a eliminării prin bilă și o creștere mare în urină. În afară de faptul că proba este întrebuințată în cursul hepatitelor și cirozelor, proba are avantajul că poate fi practicată și în ictere.

Interpretare. La normali, colorantul apare după 1/2 de oră. Intensitatea colorantului crește treptat, atingînd maximul după 6—8 ore. În cazuri patologice, intensitatea colorantului este maximă în primele ore, invers decît la normali.

Proba cu roșu bengal. După ce se recoltează 5 ml sînge, se injectează intravenos o soluție roșu bengal de 1,5 mg/kilocorp. După 3 și 45 de minute de la injectare se recoltează sînge, iar în ser se determină retenția de colorant. Valori mai mari de 4 mg‰ plasmă sînt valori patologice.

Proba cu azorubin S. Azorubinul S se elimină în mod normal în proporții de peste 90% prin bilă. În caz de tulburări funcționale hepatice, colorantul apare în urină.

Reactiv: Soluție azorubin S 1%.

Acid clorhidric N.

Tehnica. Înainte de începerea probei, vezica se golește complet. Se injectează apoi 4 ml din soluția 1% azorubin, iar bolnavul este pus să urineze la intervale de 1/2 de oră. Probele sînt fotocolorimetrate imediat. Se urmărește eliminarea colorantului atît timp cît cel puțin 2 probe de urină nu mai conțin colorant.

Metoda de determinare a colorantului. La 3 ml urină se adaugă 1 ml acid clorhidiric, se agită și se fotocolorimetrează cu filtru S_{53}, cuva de 1 cm. Martor-urină fără acid clorhidric. Conținutul procentual al colorantului eliminat se citește pe o curbă-etalon efectuată cu soluția de azorubin „S".

Interpretare. Indivizii cu ficatul normal, chiar în prima urină, elimină maximum 10—12% din colorant. Durata eliminării este de 1—3 ore. În alterările hepatice, substanța eliminată prin urină atinge valori pînă la 100%. Eliminarea se poate întinde pe mai mult de 24 de ore.

Staza biliară poate micșora eliminarea colorantului, acest fapt constituind o sursă de eroare.

Proba cu azorubin „S" are valoare în leziunile hepatice cu evoluție anicterică și în hepatite.

Proba cu fucsina „S". Colorantul, fucsina S este transformat în parenchimul hepatic și eliminat prin urină.

Reactivi: 1. Soluție apoasă de fucsină S 5%.

2. Acid acetic glacial.

Tehnica. Bolnavul, după ce își golește vezica, bea 20 ml din soluția apoasă de fucsină S, încălzită la 30—35° și imediat mai bea 500 ml ceai slab. Urina se recoltează din oră în oră, timp de 8 ore.

Din fiecare probă de urină se iau 5 ml și se pun în eprubete așezate la rînd, adăugînd în fiecare cîteva picături de acid acetic glacial. După 10 minute se citesc rezultatele, notîndu-se cu una pînă la 4 cruci după intensitatea colorantului. Urinile cu conținut biliar sau urinile colorate sînt defecate cu acetat de Pb.

Cantități mici de colorant se pierd prin filtrare, dar nu modifică rezultatele.

Calcul. Conținutul procentual al colorantului eliminat se determină pe o curbă etalon în prealabil cu o soluție de fucsină. Concentrația colorantului exprimată în mg/ml se înscrie pe abscisă, iar extincțiile corespunzătoare pe ordonată.

Cantitatea de colorant citită pe curbă se raportează la cantitatea de urină eliminată în proba respectivă.

FUNCȚIILE EXCRETOARE ALE FICATULUI

În ultimii ani, o serie de autori au aplicat în explorarea ficatului concepția de *clearance*, cunoscută pentru studiul funcției renale. S-a pornit de la constatarea că o serie de substanțe sînt *electiv* și *rapid* eliminate prin emonctoriul hepatic, cînd acesta este sănătos, și sînt reținute sau eliminate prin emonctoriul renal cînd ficatul este bolnav. Cum majoritatea acestor compuși sînt coloranți — de diferite structuri chimice — fenomenul este cunoscut sub numele de *cromopexie* sau *cromoexcreție*.

Pentru ca o substanţă să poată fi utilizată în studiul *clearance*-ului trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:

1. toleranţă absolută din partea organismului;
2. solubilitate deplină în umorile organismului;
3. eliminare rapidă prin emonctoriul hepatic.

După felul în care se urmăreşte variaţia colorantului introdus în organism distingem următoarele categorii de teste:

A. Teste bazate pe dispariţia coloranţilor din sînge.

B. Teste bazate pe apariţia coloranţilor în bilă.

C. Teste bazate pe apariţia coloranţilor în urină.

BAZELE TEORETICE ALE *CLEARANCE*-ULUI HEPATIC

Dacă se introduce în circulaţie o substanţă care difuzează prin peretele capilar — considerat ca o membrană fizică uniformă — şi se elimină prin emonctorii există teoretic două modalităţi de dispariţie din sînge, în funcţie de timp:

1. Substanţa descreşte constant, în progresie aritmetică, curba de scădere reprezentînd o funcţie liniară.

2. Substanţa descreşte inconstant — logaritmul concentraţiei plasmatice variind liniar, în raport cu timpul — curba de scădere reprezentînd în acest caz o funcţie exponenţială.

În fenomenele biologice întîlnim modalitatea a doua care permite aplicarea formulei Teorell, valabilă pentru curbele exponenţiale:

$$C_t = C_o \cdot e^{-kt}, \qquad (1)$$

unde: C_t reprezintă concentraţia substanţei la timpul t;

C_o reprezintă concentraţia substanţei la timpul virtual 0;

K reprezintă „constanta de viteză a scăderii" sau „parametrul curbei".

De aici:

$$K = \frac{\ln C_o - \ln C_t}{T} \qquad (2)$$

sau trecînd la logaritmii în baza 1°:

$$K = 2{,}3 \frac{\log C_o - \log C_t}{\Delta T} \qquad (3)$$

Acest raport, între diferenţa logaritmilor concentraţiilor plasmatice şi timpii respectivi, este definit „fracţiunea de *clearance*".

Clearance-ul, conceput ca raportul dintre cantitatea de substanţă eliminată prin emonctoriul hepatic şi concentraţia sa plasmatică, este dat de:

$$C = \frac{Q}{P}, \qquad (4)$$

unde: Q = cantitatea de substanţă excretată;
P = concentraţia sa plasmatică.

Cum însă *clearance*-ul reprezintă volumul de plasmă epurat în unitatea de timp trebuie stabilită relaţia cu volumul de distribuţie.

$$K = \frac{C}{V}, \qquad (5)$$

adică „parametrul curbei" este direct proporţional cu *clearance*-ul şi invers proporţional cu volumul de distribuţie.

De aici:

$$V = \frac{C}{K} \text{ şi } C = K \cdot V. \qquad (6)$$

Deci, se poate calcula *clearance*-ul, cunoscîndu-l pe K şi V. K se obţine uşor din formula (3).

Pentru calcularea lui V trebuie teoretic să împărţim cantitatea de substanţă injectată (q) la concentraţia plasmatică pe care aceasta ar avea-o la echilibru (P):

$$V = \frac{q}{P}.$$

Cum însă, în timpul necesar ca substanţa să ajungă la echilibru, ea a început deja să fie eliminată, calculul devine complicat, necesitînd corecţii laborioase.

În acest caz se atribuie lui P valoarea maximă virtuală, pe care colorantul ar fi atins-o dacă s-ar fi distribuit instantaneu în volumul său de soluţie.

Pentru a calcula acest maxim se fac determinări ale lui P la diferite intervale de timp, se reprezintă curba grafic şi se face extrapolarea la timpul 0: dreapta obţinută se prelungeşte şi, la întretăierea ordonatei, se obţine P_0.

Tehnica *clearance*-ului la BSP. În practică se utilizează determinarea aşa-numitului *timp de înjumătăţire*. El reprezintă timpul la care concentraţia iniţială (C_0 = concentraţia virtuală la timpul 0) a ajuns la jumătatea sa. În acest caz particular, valoarea lui K se poate calcula din formula:

$$K = \frac{0{,}693}{T^{1}/_{2}}.$$

Clearance-ul calculat pe această bază reprezintă *clearance*-ul fracţionat, adică volumul plasmatic epurat total de substanța cercetată într-un minut.

Tehnica recoltării. Bolnavul trebuie să nu mănînce cu cel puțin 10 ore înainte, se cîntărește și i se injectează intravenos în aproximativ 30 de secunde o cantitate de BSP de 5 mg/kilocorp. Prin venopuncție din brațul opus se fac următoarele recoltări: la 5, 10, 15 și 20 de minute. În cirozele hepatice, timpul se poate prelungi pînă la 45 de minute. Se notează exact cu ajutorul unui cronometru începutul și sfîrșitul injectării colorantului și al prelevărilor de sînge.

Modul de lucru. Se centrifughează sîngele și se pun apoi pentru fiecare probă 0,5 ml ser + 5 ml NaOH N/10.

Pentru blanc, 0,5 ml ser + 5 ml HCl N/10.

În cazul cînd serul din toate probele are aceeași tentă de culoare se lucrează cu o singură probă de blanc.

Se citește extincția față de blanc, cu cuva de 1 cm pe filtrul S_{57}, la maximum 20 de minute de la adăugarea reactivilor.

Pentru măsurarea lui K se construiește dreapta experimentală și se găsește valoarea timpului de înjumătățire, stabilindu-se pe grafic valoarea lui $\frac{C_0}{2}$.

Pe o hîrtie milimetrică se notează pe abscisă timpul, iar logaritmul natural al concentrației pe ordonată (fig. 105).

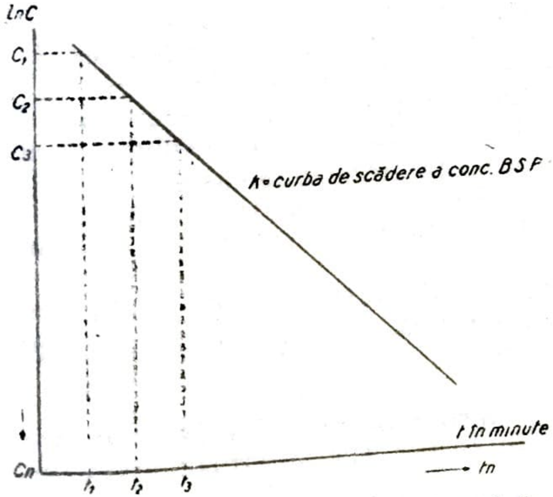


Fig. 105. — Modul de reprezentare grafică a curbei unui *clearance* fracționat.

Prin interpolarea celor două puncte se obține dreapta de scădere a concentrației BSP din serul bolnavului respectiv.

Calcularea timpului. În prima etapă se calculează media timpului de injectare, pe care o notăm cu y. Apoi se calculează media timpului de la fiecare prelevare de sînge, pe care o notăm cu: X_1, X_2, $X_3 \ldots X_n$

Din media timpului de prelevare se scade media timpului de injectare:

$$X_1 - y = t_1$$
$$X_2 - y = t_2$$
$$\vdots$$
$$X_n - y = t_n.$$

Timpul astfel obținut este trecut în grafic.

Calcularea logaritmului natural al concentrației BSP. Se înmulțește extincția fotometrică cu factorul de pantă și se obține astfel concentrația BSP în mg%. Se înmulțește apoi cu 10 pentru a obține concentrația BSP în mg/litru. Cu ajutorul tabelelor de logaritm se află logaritmul natural al fiecărei concentrații (vezi tabelul).

Stabilirea timpului de înjumătățire. În primul rînd se stabilește concentrația la timpul 0, prelungind dreapta A pînă intersectează ordonata. Punctul de intersecție reprezintă logaritmul natural al concentrației la timpul 0. Această cifră se antilogaritmează și în acest fel se obține concentrația exprimată la T_0 în mg/litru. Pentru a obține $\frac{C_0}{2}$ se împarte la 2 și se obține o valoare X. Cu ajutorul tabelelor de logaritm se scoate logaritmul natural al lui X. Valoarea acestui logaritm se notează pe ordonată. Punctul respectiv reprezintă logaritmul natural al concentrației 0 pe jumătate, la timpul T_0. Pentru a afla timpul în care celula hepatică realizează această înjumătățire se trage din punctul respectiv o paralelă la abscisă pînă intersectăm dreapta A. Din punctul intersecției se coboară o perpendiculară pînă la abscisă. Punctul găsit astfel reprezintă timpul necesar pentru înjumătățirea concentrației timpului 0.

Calcularea clearance-ului fracționat se face după formula

$$A = \frac{0{,}693}{T^{1/2}} \times 100.$$

Rezultatele se exprimă în procente.

Valori normale: *clearance* fracționat = 14%;
timp de înjumătățire = 5 minute.

TABELUL 54

Concentrația BSP în mg/litru	ln	Concentrația BSP în mg/litru	ln
1	0	51	3,93
2	0,69	52	3,95
3	1,10	53	3,97
4	1,39	54	3,99
5	1,61	55	4,01
6	1,79	56	4,03
7	1,95	57	4,04
8	2,08	58	4,06
9	2,20	59	4,08
10	2,30	60	4,09
11	2,40	61	4,11
12	2,48	62	4,13
13	2,56	63	4,14
14	2,64	64	4,16
15	2,71	65	4,17
16	2,77	66	4,19
17	2,83	67	4,20
18	2,89	68	4,22
19	2,94	69	4,23
20	3	70	4,25
21	3,04	71	4,26
22	3,09	72	4,28
23	3,13	73	4,29
24	3,18	74	4,30
25	3,22	75	4,32
26	3,26	76	4,33
27	3,30	77	4,34
28	3,33	78	4,36
29	3,37	79	4,37
30	3,40	80	4,38
31	3,43	81	4,39
32	3,47	82	4,41
33	3,50	83	4,42
34	3,53	84	4,43
35	3,56	85	4,44
36	3,58	86	4,45
37	3,61	87	4,47
38	3,64	88	4,48
39	3,66	89	4,49
40	3,69	90	4,50
41	3,71	91	4,51
42	3,74	92	4,52
43	3,76	93	4,53
44	3,78	94	4,54
45	3,81	95	4,55
46	3,83	96	4,56
47	3,85	97	4,57
48	3,87	98	4,58
49	3,89	99	4,59
50	3,91	100	4,60

Se mai poate practica și proba BSP simplificată, în care se urmărește eliminarea colorantului în timp la o încărcare standard.

Proba simplificată cu bromsulfonftaleină. Bromsulfonftaleina este eliminată din curentul sanguin de celulele reticuloendoteliale ale ficatului, iar celulele parenchimatoase excretă colorantul în bilă. În caz de alterare a parenchimului hepatic scade eliminarea colorantului, deci colorantul rămîne în sînge, iar durata este foarte mult prelungită.

Reactivi : 1. Soluția obținută prin dizolvarea a 5 g colorant în 100 ml ser fiziologic este filtrată și sterilizată la 120°, timp de 20 de minute. Soluția poate fi păstrată 2–3 luni la întuneric.

2. Hidroxid de sodiu 10% ser fiziologic.

Metoda. Se recoltează 5 ml sînge (proba 1) și apoi se injectează bolnavului încet 1 ml soluție sterilă de bromsulfonftaleină la 10 kg greutate corporală (în medie 5 ml). La 3 minute după injectare se recoltează proba 2, la 45 de minute se recoltează proba 3. De fiecare dată se recoltează cîte 5 ml sînge. În probele de sînge 1, 2 și 3 se dozează bromsulfonftaleina cu fotometrul Pulfrich.

Tehnica. La 1 ml ser din fiecare probă 1, 2 și 3 se adaugă 4 ml ser fiziologic + 2 picături de hidroxid de sodiu, se amestecă bine și se colorimetrează cu filtru galben S_{57}, cuva de 0,5 cm. Proba 1 constituie proba-martor față de care se citesc probele.

Calcul : procente % de B.S.P. retenționat în sînge $= \frac{E_2 \times 100}{E_1}$, unde :

E_1 — extincția probei la 3 minute (100 %);

E_2 — extincția probei la 45 de minute.

Proba cu bromsulfonftaleină este negativă, dacă la proba 3 de la 45 de minute se găsește mai puțin de 5% colorant. O retenție de colorant peste 5% indică o stare patologică.

Valoarea probei constă în faptul că poate servi la depistarea unei leziuni parenchimatoase hepatice în cazuri cu evoluție anicterică.

În hepatita granulomatoasă, proba cu bromsulfonftaleină este pozitivă, pe cînd alte probe funcționale hepatice pot da un rezultat negativ.

Retenție de BSP crescută se întîlnește în ciroza hepatică, colestază, carcinom hepatic și ficat gras.

FUNCȚIILE DE DETOXIFIERE-CONJUGARE ALE FICATULUI

Funcția de detoxifiere este una din acțiunile de bază ale ficatului, esențială pentru viață. Mecanismele sînt multiple și deosebit de complicate. În mod foarte general intervin în acest proces doi factori :

1. Un grup de enzime care catalizează reacţiile chimice de transformare a diferitelor componente nocive.

2. Un „rezervor" de substanţe hepatice, care sînt utilizate pentru diferitele inactivări.

De corelaţia armonioasă a acestor două elemente depinde desfăşurarea fiziologică a funcţiei de detoxifiere.

Principalele căi biochimice, utilizate de ficat, sînt următoarele:

a) **Oxidarea,** cale majoră pentru neutralizarea aminelor, ca şi a hormonilor steroizi, a santoninei, cincofenului şi a altor substanţe.

b) **Degradarea totală** la fragmente elementare. Este calea utilizată pentru neutralizarea alcaloizilor, opiaceelor, ca şi a unor hormoni steroizi.

c) **Conjugarea** reprezintă cuplarea cu metaboliţi proprii, din rezervorul hepatic, capabili a neutraliza substanţa toxică. Cei mai utilizaţi sînt:

— Aminoacizii: glicocolul este folosit la detoxifierea acidului benzoic; cisteina pentru derivaţii benzenici, naftalenici şi antracenici.

— Acidul sulfuric, care realizează aşa-numita *sulfoconjugare.* Cuplează şi inactivează în special fenolii.

— Acidul glucuronic, care realizează aşa-numita *glucuronoconjugare.* Cuplează şi inactivează o serie întreagă de substanţe din clasa alcoolilor, aldehidelor, acizilor organici şi alcaloizilor. Reprezintă calea majoră pentru neutralizarea morfinei.

— Acidul acetic, care realizează aşa-numita *acetilare.* Implicat în detoxifierea acidului paraaminobenzoic şi a sulfonamidelor. Forma sa activă, care intervine în procesele de inactivare, este acetilcoenzima A.

Reacţiile de detoxifiere duc la produşi inactivi farmacodinamic, mai puţin toxici, sau la compuşi care prin solubilitate mare pot fi uşor eliminaţi prin urină.

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A FUNCŢIEI DE EXCREŢIE

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A FUNCŢIILOR RINICHIULUI

Rinichiul execută în organism o serie de funcţii importante, esenţiale pentru menţinerea vieţii :

I. **Funcţia de excreţie.** Rinichiul reprezintă principalul emonctor al organismului. El elaborează urina, extrăgînd din sînge şi eliminînd cu ajutorul apei principalii produşi ai catabolismului, ca şi substanţele străine, inutile sau toxice.

II. **Funcţia de menţinere a echilibrului osmotic (izoosmia)** cu toate consecinţele fiziologice ale acestei homeostazii.

III. **Funcţia de menţinere a echilibrului acidobazic (izoionia),** reflectată prin pH-ul sanguin, care variază în limite foarte strînse.

IV. **Funcţii metabolice specifice ţesutului renal.** Pentru evidenţierea acestor funcţii nu s-au pus la punct tehnici speciale abordabile în laboratorul clinic.

În cele ce urmează expunem tehnicile de explorare privind primele trei funcţii enumerate.

În ceea ce priveşte explorarea biochimică specifică ţesutului renal, o serie de tehnici sînt de domeniul laboratoarelor experimentale, iar altele, utilizabile în laboratorul clinic, sînt expuse la capitolul de corelaţii metabolice.

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A FUNCŢIEI DE EXCREŢIE

Funcţia de excreţie renală se execută prin 3 mecanisme esenţiale :

Filtrarea glomerulară este rezultatul proceselor fizico-chimice de la nivelul membranei aparatului glomerular, care se comportă ca un ultrafiltru, lăsînd în condiţii normale să treacă doar apa şi moleculele mici, cu greutate sub 70 000. Filtrarea glomerulară este în funcţie de :

a) Presiunea hidrostatică (P_h) de la acest nivel. Valoarea ei este de 75 mm Hg, reprezentînd cea mai mare presiune capilară din organism.

b) Presiunea coloidosmotică a proteinelor plasmatice (P_o). Valoarea ei este de 28 mmHg.

c) Presiunea hidrostatică din interiorul capsulei Bowman (P_B). Valoarea ei este de 5 mmHg.

Valoarea presiunii de filtrare (P_F), care exprimă eficienţa filtrării glomerulare va fi :

$$P_F = P_h - (P_o + P_B)$$

$$P_F = 75 - (28 + 5) = 42 \text{ mmHg.}$$

Reabsorbţia tubulară. În 24 de ore, glomerulul filtrează 150—200 litri de ultrafiltrat. El reprezintă ceea ce se numeşte „urina primară". Din aceasta, 99% este reabsorbită la nivelul tubului, iar excreţia urinară, de 1%, reprezentînd 1—1,5 l, formează „urina definitivă".

Se reabsorb două categorii de substanţe :

1. Substanţele deosebit de utile pentru organism, ca : glucoza, Cl, Na, Ca, Mg, bicarbonaţii şi altele. Reabsorbţia lor este totală şi apar în urină, numai la depăşirea unei concentraţii sanguine, numită „prag de eliminare".

2. Substanţele rezultate din metabolismul celular se reabsorb doar parţial. Ele sînt eliminate prin urină, imediat ce apar în sînge (de exemplu, ureea, amoniacul, acidul uric, creatinina, sulfaţii şi altele) şi nu au prag de eliminare, concentraţia lor unitară fiind mult mai ridicată decît cea sanguină. Substanţele introduse accidental sau cele foarte toxice prezintă o reabsorbţie nulă.

Reabsorbţia se face la două niveluri distincte :

a) Tubul proximal, unde are loc o reabsorbţie obligatorie (totală sau parţială).

b) Tubul distal, unde are loc o reabsorbție facultativă.

Excreția tubulară. Are loc la nivelul tubului proximal, care poate juca și rolul unui organ efector de eliminări selective. Astfel, o serie de substanțe, pe lîngă ultrafiltrare glomerulară sînt excretate la nivelul celulelor tubulare.

Redăm schematic principalele posibilități de excreție renală, în funcție de mecanismul fiziologic :

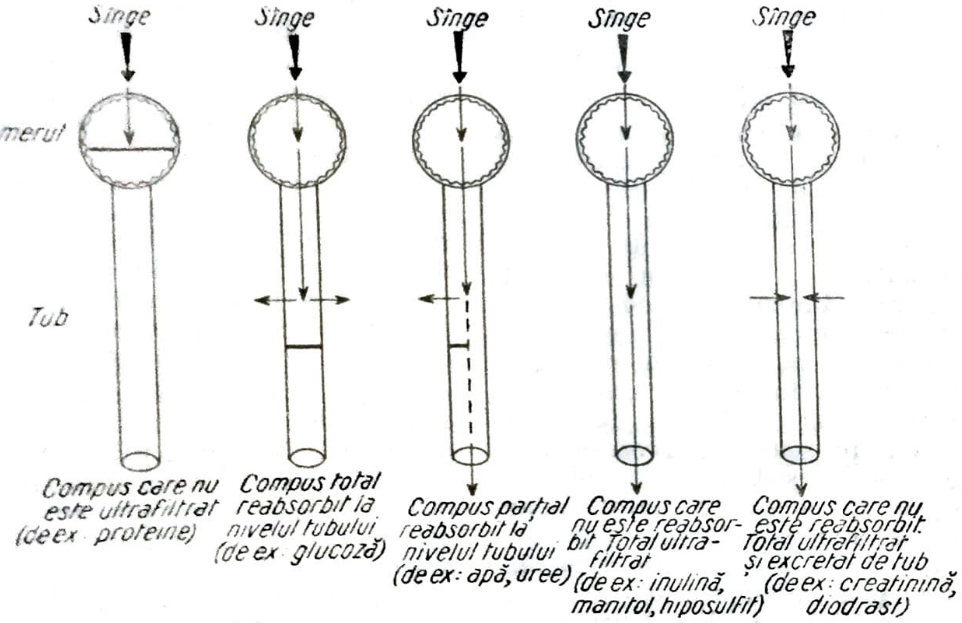

Sînge
Sînge
Sînge
Sînge
Sînge
Glomerul
Tub
Compus care nu este ultrafiltrat (de ex. proteine)
Compus total reabsorbit la nivelul tubului (de ex. glucoză)
Compus parțial reabsorbit la nivelul tubului (de ex: apă, uree)
Compus care nu este reabsorbit. Total ultrafiltrat (de ex: inulină, manitol, hiposulfit)
Compus care nu este reabsorbit. Total ultrafiltrat și excretat de tub (de ex: creatinină, diodrast)

Fig. 106. — Mecanismul de excreție renală.

Expresia funcției renale de excreție este formarea și eliminarea urinii.

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A URINII

Recoltarea. Determinările calitative și cantitative se fac pe urina colectată în 24 de ore. Prima emisie de dimineață se aruncă, colectîndu-se celelalte emisiuni în decurs de 24 de ore într-un vas foarte curat.

La femei se recomandă toaleta vulvo-vaginală; adesea este necesar chiar cateterismul pentru a nu avea erori în determinarea proteinelor. De asemenea, recoltarea se va face în afara perioadei menstruale, pentru a evita prezența de hematii de această proveniență, precum și erorile în determinarea proteinelor.

Din cauza descompunerii rapide, în special pe timp cald, este necesar să se păstreze urina la răcitor (evitînd însă înghețarea) sau se vor adăuga antiseptice ca timol, toluen etc.

Timolul în cantitate de 0,1 g/100 ml urină nu modifică calitativ urina; în cantități mai mari interferează însă cu cercetarea proteinelor și pigmenților biliari. Acidul boric nu este un bun stabilizator, deoarece împiedică dozarea glucozei și precipită cristalele rombice de acid uric. Formolul împiedică dozarea glucozei și acetonei. Cloroformul împiedică cercetarea sedimentului și depistarea glucozei. Cianura mercurică împiedică dozarea glucozei. Cele mai satisfăcătoare rezultate le dă toluenul aplicat sub forma unui strat subțire care să acopere toată suprafața urinii.

Caracterele fizico-chimice ale urinii

Cantitatea variază în raport cu vîrsta și cu greutatea. Copiii elimină o cantitate de 3—4 ori mai mare decît adulții, în raport cu greutatea.

TABELUL 55

Cantitatea de urină în 24 de ore

Vîrsta	ml	Vîrsta	ml
1—2 zile	15— 60	1 an — 3 ani	500— 600
3—10 zile	100—300	4 ani— 8 ani	600—1 000
10 zile—2 luni	250—450	9 ani—15 ani	800—1 400
2 luni—1 an	400—500	Peste 15 ani	1 000—1 600

La omul adult, cantitatea de urină este între 1 200 şi 1 600 ml şi variază în raport cu cantitatea de lichide ingerate. Ea este scăzută în diaree şi în cursul stărilor febrile. Este crescută în scleroze renale, diabet etc.

Aspectul. Urina proaspătă de obicei este clară şi transparentă, dar poate fi opalescentă, datorită prezenţei de puroi sau a unor săruri, ca: fosfaţi, carbonaţi, uraţi sau oxalaţi. Dispariţia opalescenţei în urina acidulată cu acid acetic 1/10 indică prezenţa fosfaţilor sau a carbonaţilor care astfel au trecut în soluţie. Dispariţia opalescenţei la încălzire denotă prezenţa uraţilor. Dacă opalescenţa persistă în ambele probe, aceasta se datorează puroiului.

Urinile vechi devin tulburi, fie prin contaminarea cu bacterii, fie datorită sărurilor alcaline, ca rezultat al descompunerii lor. Ţinute la rece (+4°) mai mult timp, în toate urinile se produce o uşoară opalescenţă datorită mucusului, leucocitelor şi celulelor epiteliale cu depunerea unui sediment la fund. Această sedimentare nu are semnificaţie clinică. În urinile acide poate apărea un sediment alb-roz datorit uratului amorf, în cele alcaline poate apărea un sediment gros, albicios, de fosfat amorf. Puroiul dă un sediment gros, mucoid, albicios. Sîngele dă un sediment de coloraţie roşie-brună-neagră. Opalescenţa datorită bacteriilor nu poate fi îndepărtată prin metodele obişnuite — centrifugare sau filtrare prin hîrtie de filtru — ci prin adăugare de 5 g talc sau de pămînt de infuzori la 100 ml urină, urmată de agitare şi apoi de filtrare.

Culoarea urinii normale este galbenă-roşiatică şi ea se datoreşte pigmenţilor pe care îi conţine, ca: urocrom, urobilină, uroeritrină, porfirină. Urinile diluate sau alcaline au o culoare mai deschisă faţă de cele concentrate sau acide care au culoarea chihlimbarului. Urina poate prezenta o coloraţie mai intensă în afecţiunile grave ale ficatului, în stază de origine cardiacă, în boli infecţioase etc. O urină palidă găsim în insuficienţa renală, cînd rinichiul pierde capacitatea de a transforma cromogenii în pigmenţi. Modificările de culoare pot fi datorite sîngelui, uraţilor de amoniac, sodiu şi potasiu sau altor pigmenţi anormali, precum şi medicamentelor: albastru de metilen colorează urina în verde-albastru, piramidonul în roz-roşiatic, aspirina în roşu, fenolul, rezorcina, salolul, pirogalolul şi taninul în brun pînă la negru.

Mirosul. Urina proaspătă are un miros caracteristic aromatic, datorit acizilor volatili sau substanţelor numite „urinoide". În urinile concentrate, mirosul este mai marcat. Urinile infectate au miros amoniacal. Mirosul de fructe sau de cloroform apare în acidoză. Un miros neplăcut apare şi după ingestia de cantităţi mari de sparanghel, hrean, usturoi.

Densitatea sau greutatea specifică a urinii se determină cu ajutorul urodensimetrului. Ea variază în mod normal între 1,015 şi 1,025; poate varia considerabil în funcţie de substanţele pe care le are în soluţie, ca: cloruri, uree, glucoză etc. şi în raport cu volumul. (O excepţie se întîlneşte în diabetul zaharat, cînd densitatea este mare, cu toate că volumul este mult crescut datorită prezenţei glucozei.) Urina de dimineaţă fiind mai concentrată are densitatea mai mare.

Determinarea densităţii. Se pune urina cu grijă pentru a nu face spumă într-un cilindru suficient de lung şi cu diametru mare, spre a nu împiedica introducerea urodensimetrului.

Citirea se face la meniscul inferior. Urodensimetrele au indicată temperatura la care sînt calibrate pentru a fi utilizate.

Reacţia urinii. Individul supus unei alimentaţii mixte prezintă în urina de 24 de ore o reacţie acidă la turnesol: pH-ul urinii normale este în jurul lui 6, cu variaţii în cursul zilei între 5 şi 7,2. Reacţia este uşor modificată la vegetarieni (pH 6,6). Regimul carnat produce, din contra, o scădere a pH-ului. Aciditatea urinii provine din sărurile acide (fosfaţi monosodici, acid uric şi uraţi acizi), precum şi datorită acizilor organici. Urina poate deveni alcalină prin fermentare microbiană. Aciditatea este crescută în artritism, diabet zaharat şi coma diabetică. O reacţie acidă a urinii se observă în insuficienţa renală gravă, cînd rinichiul a pierdut capacitatea de a elimina amoniacul. Determinările de amoniac în urina de 24 de ore pot da indicaţii importante. Reacţia alcalină se observă după vărsături acide abundente, precum şi în timpul resorbţiei edemelor. Infecţia căilor urinare cu anumiţi microbi provoacă fermentaţia amoniacală a urinii.

pH-ul urinii se determină ionometric sau colorimetric. Rezultatele obţinute cu metodele colorimetrice sînt suficiente pentru nevoile clinice. Urina de cercetat va fi proaspătă, recoltată sub toluen şi păstrată la rece.

a) *Metoda colorimetrică* foloseşte *reactivul Guillaumin*, compus din:

Roşu de metil	0,06 g.
Albastru de bromtimol	0,20 g.

Hidroxid de sodiu N/20 — 10 ml.

Substanțele se amestecă într-un mojar cu hidroxidul de sodiu, apoi se trec într-un balon cotat de 500 ml. Se spală mojarul cu apă distilată, care se adaugă în balon și se completează cu apă distilată pînă la 500 ml.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 5 ml urină diluată 1/5 cu apă distilată recent fiartă + 5 picături indicator. Se agită ușor și se citește culoarea obținută :

— pH 4,6 are culoare roșie;
— pH 5 are culoare roșie-intensă;
— pH 5,4 are culoare roșie-galbenă;
— pH 5,8 are culoare galbenă;
— pH 6,2 are culoare verde-galbenă;
— pH 6,6 are culoare verde;
— pH 7 are culoare verde-albastră;
— pH 7,4 are culoare albastră.

b) ***Metoda cu albastru de bromtimol*** folosește reactivul numai din albastru de bromtimol în concentrația de 0,04 g în 100 ml etanol 50%.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun : 1 ml urină clară + 2—3 picături de albastru de bromtimol.

Culoarea albastră indică alcalinitatea, culoarea galbenă, aciditatea, iar culoarea verzuie indică neutralitatea.

c) ***Metoda cu hîrtie de turnesol*** este cea mai frecvent utilizată în laborator. Se pune în contact urina de cercetat cu hîrtia de turnesol roșie sau albastră. În urinile acide, hîrtia albastră devine roșie, iar în urinile alcaline, hîrtia roșie devine albastră. În urinile neutre, hîrtia de turnesol nu-și modifică culoarea.

DETERMINAREA SUBSTANȚELOR ANORGANICE DIN URINĂ

Reziduul total. Se evaporă un anumit volum de urină pe baia de apă pînă la consistența păstoasă, apoi se usucă la 100°, timp de 2—3 ore. Se lasă în exsicator cu acid sulfuric pînă la răcire. Cîntărirea trebuie făcută cît mai repede din cauza higroscopicității extractului. Cifra obținută reprezintă reziduul total sau extractul sec și se raportează la cantitatea din 24 de ore. Prin acest procedeu se pierde o oarecare cantitate de substanțe azotoase.

Reziduul mineral. Pentru determinarea sărurilor minerale conținute în urină, capsula cu reziduu total se calcinează pînă la roșu, distrugîndu-se substanțele organice. Se lasă în exsicator pînă la răcire și se cîntărește. Cifra obținută reprezintă reziduul mineral.

Diferența dintre reziduul total și cel mineral reprezintă greutatea materiilor organice. Cifrele normale la adult :

— reziduul total sau extract sec, 40—65 g pentru urina din 24 de ore;
— reziduul fix sau săruri minerale, 15—25 g;
— substanțe organice, 24—40 g.

După vîrsta de 50 de ani, aceste cantități scad.

Dozarea clorurilor

Metoda Volhard. Se tratează urina cu o cantitate precisă de soluție de nitrat de argint. Excesul de reactiv este titrat cu o soluție de sulfocianură de amoniu în prezența alaunului de fier și amoniu ca indicator.

Reactivi : 1. Nitrat de argint N/10. 16,989 g în 1 000 ml de acid nitric 25%.

2. Alaun de fier și amoniu 5 g%.

3. Sulfocianură de potasiu N/10 9,71 g în 1 000 ml apă bidistilată, 10 ml din soluția de sulfocianură de amoniu trebuie să corespundă cu 10 ml soluție de nitrat de argint.

Tehnica. Într-un Erlenmeyer de 100 ml se măsoară : 5 ml urină + 10 ml apă bidistilată + 10 ml soluție de nitrat de argint + 5 ml alaun feric.

Cu ajutorul unei biurete Mohr se face titrarea cu soluția de sulfocianură de potasiu pînă la apariția unei colorații persistente galbene-roșietice.

Calcul : 1 ml Ag NO_3 N/10 corespunde la 5,85 mg Na Cl sau la 3,55 mg Cl. mg Na Cl ‰ ml urină = (10-*n*) × 200 × 5,85 mg Cl ‰ ml urină = (10-*n*) × 200 × 3,55.

n = cantitatea de sulfocianură de amoniu utilizată la titrare.

Rezultatele obținute în mg sînt transformate în g și raportate la cantitatea din 24 de ore.

Metoda Mohr. Se precipită clorul și clorurile sub formă de clorură de argint, cu o soluție de azotat de argint în prezența cromatului de potasiu ca indicator.

Reactivi : 1. Acetat de sodiu 10%. 10 g acetat de sodiu sînt dizolvate în 100 ml acid acetic 3%.

2. Cromat de potasiu 5%.

3. Azotat de argint N/10.

Tehnica. Din urina de 24 de ore se iau 10 ml urină filtrată sau centrifugată într-un balon de 100 ml, la care se adaugă 2 ml acetat de sodiu 10% + 2—3 picături cromat de potasiu 5%. Se titrează cu azotat de argint N/10 pînă la culoarea roșie-cărămizie.

Calcul: 1 ml Ag NO_3 N/10 = 5,85 mg Na Cl
g ‰ cloruri = *n* × 0,585.

n = ml Ag NO_2 N/10 folosiți la titrare.

Rezultatele obţinute sînt raportate la cantitatea din 24 de ore.

Normal: 10—15 g clorură de sodiu sau 120—170 mEq.

Echilibrul dintre aportul şi eliminarea clorurii de sodiu este modificat în special în afecţiunile renale. Scăderea eliminării de cloruri însoţeşte formarea de edeme. În ocluzia intestinală, în vărsături incoercibile, cantitatea de cloruri este scăzută. În cazul cînd urina conţine foarte mult clor se va adăuga o cantitate de 20 ml nitrat de argint. Dacă urina conţine bromuri şi ioduri datorită medicamentelor ingerate, rezultatele nu vor fi corecte, întrucît aceste substanţe precipită cu nitratul de argint. În acest caz, dozările se vor face în afara perioadelor de tratament cu medicamentele respective.

Dozarea fosforului anorganic. *Metoda Biggs.* Molibdatul de amoniu în mediu acid formează cu ionul fosforic acidul fosfomolibdenic care, în prezenţa hidrochinonei (reductor), dă o culoare albastră de o intensitate proporţională cu cantitatea de fosfor.

Reactivi: 1. Acidul molibdenic: se dizolvă 25 g molibdat de amoniu în 300 ml apă, apoi se adaugă 75 ml acid sulfuric concentrat (D = 1,84) şi se completează la 500 ml cu apă.

2. Hidrochinonă 20 g în 1 000 ml apă + 1 ml acid sulfuric concentrat.

3. Carbonat-sulfit: 75 g de sulfit de sodiu în 500 ml apă adăugat la 2 litri soluţie 20% carbonat de sodiu (cîntărit anhidru).

4. Bisulfit de sodiu 7 g la 100 ml apă.

Tehnica. Într-un balon cotat de 100 ml se pun: 0,1 ml urină, 20 ml apă distilată, 5 ml bisulfit de sodiu, 5 ml acid molibdenic şi 5 ml hidrochinonă. După 5 minute se adaugă 32 ml carbonat-sulfit şi se completează pînă la 100 ml cu apă distilată; se agită puternic, iar după 5 minute se examinează la fotometrul Pulfrich cu filtru S_{61}, cuva de 1 cm. În paralel se face o probă în alb, urina fiind înlocuită cu apă distilată.

Calcul: mg% fosfor anorganic = $E \times 508$.

E = extincţia citită la fotometru.

Fosforul urinar se dozează în urinile limpezi. În cazul cînd urinile sînt tulburi din cauza precipitatului mineral se acidulează sau se acalinizează urina în funcţie de natura precipitatului. Urinile cu albumină sînt tratate cu acid tricloracetic 20% V/V. După o încălzire de 20 minute, amestecul este răcit la curent de apă şi apoi centrifugat. Se iau 0,2 ml supernatant, se trec într-un balon de 100 ml şi se continuă tehnica de dozare a fosforului ca mai sus.

Dozarea sulfului

În urină găsim sulful sub trei forme: sulf anorganic sub formă de sulfaţi, derivaţii sulfoconjugaţi şi sulf organic în anumiţi aminoacizi, ca: cistină, cisteină, metionină.

Dozarea sulfului anorganic. Sulfaţii sînt precipitaţi cu o soluţie de benzidină, dînd sulfatul de benzidină care este descompus la fierbere, iar acidul sulfuric format este titrat cu hidroxid de sodiu.

Reactivi: 1. Benzidină 40 g dizolvată în 50 ml HCl concentrat şi completată cu apă la 1 000 ml.

Se lucrează cu o soluţie care se diluează extemporaneu cu apă distilată, în proporţie de 1/20 din soluţia de mai sus.

2. Acid clorhidric N/10.

3. Hidroxid de sodiu N/10.

Tehnica. Într-un balon Erlenmeyer de 500 ml se pun 20 ml urină filtrată şi neutralizată + 2 ml acid clorhidric N/10 + 350 ml soluţie diluată de benzidină. Se agită şi se lasă în repaus 20 de minute. Se centrifughează 30 de minute la 3 000 ture/min. Se spală precipitatul cu 5 ml apă distilată, se adaugă 30 ml apă distilată + 2 picături de fenolftaleină. Se încălzeşte la fierbere cîteva minute. Se titrează acidul sulfuric eliberat cu hidroxid de sodiu N/10 pînă la culoarea roz.

Calcul: sulf exprimat în SO_3 g la litru = $= n \times 0{,}004 \times 50$.

1 ml NaOH N/10 = 0,004 g sulfat.

n = ml de hidroxid de sodiu N/10 utilizaţi la titrare.

Dozarea sulfului din sulfoconjugaţi. Acidul clorhidric la cald hidrolizează sulfoconjugaţii, punînd în libertate acidul sulfuric.

Reactivi: ca mai sus.

Tehnica. Într-un balon Erlenmeyer de 100 ml se pun 20 ml urină + 20 ml acid clorhidric diluat N/10; se fierbe 15 minute, apoi se lasă să se răcească. Se trece într-un balon de 500 ml şi se neutralizează cu NaOH N/10 în prezenţa fenolftaleinei, după care se adaugă: 2 ml acid clorhidric *M*/10 + 350 ml soluţie de benzidină diluată. Se agită puternic şi se lasă în repaus 20 de minute. Se centrifughează şi se procedează ca mai sus la dozarea sulfului anorganic.

Calcul: n = ml de hidroxid de sodiu N/10 utilizaţi la titrarea sulfului anorganic.

n' = ml de hidroxid de sodiu N/10 utilizaţi la titrarea sulfului din sulfoconjugaţi.

Sulf de sulfoconjugare = $(n' - n) \times 0{,}2$ exprimat în SO_3 $g^0/_{00}$.

Dozarea sulfului total. Toate formele în care se află sulful sînt transformate în sulfaţi cu ajutorul unui oxidant.

Reactivi: 1. $KClO_3$.
2. HCl N/10.
3. Zaharoză N/10.
4. NaOH N/10.

Tehnica. Într-un balon Erlenmeyer se introduc 20 ml urină + 0,20 g clorat de potasiu + 20 ml acid clorhidric N/10. Se fierbe 20 de minute şi se adaugă picătură cu picătură 1 ml dintr-o soluţie de zaharoză N/10. Se fierbe din nou cîteva minute şi se răceşte. După răcire se trece conţinutul într-un balon de 500 ml şi se neutralizează cu hidroxid de sodiu N/10 în prezenţa fenolftaleinei; se adaugă 2 ml acid clorhidric N/10 + 350 ml soluţie de benzidină diluată.

Se agită şi se lasă în repaus 20 de minute; se filtrează şi se procedează mai departe ca la titrarea sulfului anorganic.

Calcul: sulful total exprimat în SO_3 la litru = $= 0{,}2 \times n$.

n = ml de hidroxid de sodiu N/10 utilizat la titrarea sulfului total.

Sulful organic se calculează prin diferenţa de sulf total—sulf anorganic.

Valori normale: sulf total = 3 g urina din 24 de ore;
sulf anorganic = 2 g urina din 24 de ore;
sulf sulfoconjugare = 0,4 g în urina din 24 de ore.

Valori crescute apar în intoxicaţii cu benzină şi derivaţii anilinei, în distrugeri de proteină, în tuberculoză intestinală, peritonite şi catare intestinale.

Dozarea calciului

Calciul este precipitat sub formă de oxalat de calciu, apoi este titrat cu permanganat de potasiu N/100.

Reactivi: 1. Soluţie saturată oxalat de amoniu.
2. Amoniac 2%.
3. H_2SO_4 N/1.
4. $KMnO_4$ N/100.

Tehnica. Se diluează 1 ml de urină cu 4 ml apă. Se iau 2 ml din urina diluată, se adaugă 2 ml apă şi 1 ml soluţie saturată de oxalat de amoniu. Se lasă în repaus la temperatura laboratorului 2—24 de ore. Se centrifughează, se îndepărtează prin sifonare lichidul clar de deasupra, iar precipitatului rămas i se adaugă 4 ml soluţie de amoniac 2% pentru spălare. Se centrifughează din nou şi se repetă operaţia de spălare de 2—3 ori. Precipitatul rămas de la ultima spălare se dizolvă în 2 ml acid sulfuric N/1, ţinînd eprubeta în baie de apă la 60—70°, timp de 2 minute. Soluţia caldă se titrează cu n ml $KMnO_4$ N/100 pînă la o culoare slab roză, care persistă 1 minut. În paralel se lucrează o probă în alb, identică cu proba de cercetat, urina fiind înlocuită cu apă distilată, titrînd pînă la aceeaşi cifră cu n' ml $KMnO_4$ N/100.

Calcul: 1 ml $KMnO_4$ N/100 = 0,2 mg Ca.
mg Ca% = $(n - n') \times 0{,}2 \times 250$.

Valori normale pentru calciu în 24 de ore sînt cuprinse între 70 şi 300 mg calciu.

Dozarea plumbului în urină

Metoda Rona constă în alcalinizarea urinii cu amoniac, în care caz se precipită fosfaţii alcalinoteroşi şi antrenează plumbul total. Plumbul este transformat prin ardere la 600° în sufura de plumb şi apoi în cromat de plumb, care este dozat iodometric.

Reactivi: 1. Acid clorhidric concentrat, HCl diluat 1/2 şi HCl 10%.
2. Acid azotic concentrat şi NO_3H diluat 1/2.
3. Acid acetic 5%.
4. Amoniac.
5. Hidrat de sodiu 25%.
6. Hidrogenul sulfurat care se obţine din tratarea SNa_2 cu ClH 10%.
7. Sulfura de sodiu care se obţine tratînd o soluţie 33% NaOH cu SH_2. Sulfura de sodiu se diluează de 3—4 ori înainte de întrebuinţare.
8. Apă distilată proaspăt saturată cu SH_2 şi acidulată cu 1 ml ClH 10%.
9. Cromat de K 1%.
10. Roşu de metil 0,1 g în 100 ml alcool.
11. Fenolftaleină 0,1 g în 100 ml apă.
12. Tiosulfat de sodiu N/200.
13. Iodură de potasiu.
14. Amidon 1%.

Tehnica. Se ia 1 litru de urină proaspătă sau conservată cu timol şi se alcalinizează intens cu amoniac. Se lasă în timpul nopţii la temperatura camerii şi se formează un precipitat care se separă de lichidul supernatant prin filtrare pe un filtru cutat. După filtrare se trece filtrul cu precipitat cu tot, într-o capsulă de porţelan sau cuarţ, se usucă pe baie de apă sau la 105° şi apoi se incinerează la 600°.

Cenuşa albă după răcire este adusă în 5 ml HCl concentrat şi se completează volumul cu apă la 25 ml. Amestecul se încălzeşte agitînd pe o baie de apă, se filtrează într-un pahar Berzelius de 400 ml şi se spală reziduul după filtru de 6 ori, alternînd cu HCl 10% şi apă distilată, încălzită la fierbere în prealabil; apele de spălare se culeg în paharul Berzelius în care s-a pus primul filtrat.

Se neutralizează soluţia care conţine tot Pb prin adăugare de NaOH 25% pînă ce apare o opalescenţă persistentă. Dacă nu se formează opalescenţa pentru a evita adăugirea unui exces de sodă se face neutralizarea faţă de roşu de metil, adăugîndu-se NaOH pînă ce soluţia se îngălbeneşte.

Se diluează apoi pînă la circa 300 ml şi se lasă să se răcească; se barbotează soluţia cu H_2S timp de o oră şi se lasă să stea peste noapte. Se filtrează apoi pe un filtru cantitativ (12 cm diametru) şi se spală precipitatul de pe filtru cu apă proaspătă saturată cu H_2S. Precipitatul de sulfură de Pb este dizolvat în 10–20 ml acid azotic diluat (1 : 1) cald şi se spală apoi filtrul de 10–15 ori cu apă distilată caldă. Se concentrează volumul soluţiei de azotat de Pb la 5 ml, se diluează pînă la 25 ml cu apă distilată fierbinte, se filtrează printr-un filtru fără cenuşă de 7 cm, se culege filtratul într-un Berzelius, spălînd bine vasul şi filtrul cu apă distilată fierbinte.

Filtratul şi apele de spălare sînt concentrate la 25 ml şi neutralizate faţă de fenolftaleină cu NaOH 25%, apoi se adaugă pînă la dispariţia culorii acid acetic 5% şi apoi 2 ml de acid în exces. Se încălzeşte la fierbere şi se adaugă 1 ml dintr-o soluţie 1% cromat de potasiu. Se lasă o oră pe baie de apă şi apoi peste noapte la termostat la 37°. Se fierbe din nou, se filtrează pe un filtru fără cenuşă, se spală paharul şi filtrul de 15 ori cu apă distilată fiartă, se dizolvă precipitatul în 5–15 ml HCl rece, diluţie 1 : 2, se spală imediat filtrul cu apă distilată rece şi filtratul împreună cu apele de spălare se culeg în vasul care a servit la precipitarea cromatului de Pb.

Se adaugă soluţiei de cromat de Pb un exces de iodură de potasiu şi după adăugarea cîtorva picături de amidon se titrează iodul liberat cu o soluţie N/200 tiosulfat de sodiu.

Calcul: 1 ml tiosulfat de sodiu N/200 = = 0,345 mg Pb;
mg Pb $^0/_{00}$ ml urină = $n \times 0{,}345$, în care:
n = numărul de ml tiosulfat întrebuinţaţi la titrare.

Pentru determinările de Mg, Na şi K vezi metodele descrise la capitolul respectiv.

Determinarea substanţelor organice din urină

Dozarea azotului total. *Metoda Kjeldahl.* Metoda este aceeaşi ca la dozarea în sînge. Determinarea se face pe 0,2–0,5 ml urină.

Valorile normale sînt cuprinse între 20 şi 30 g în 24 de ore. Urinile care conţin proteine sînt deproteinizate în prealabil cu acid tricloracetic 10% pentru a se elimina azotul proteic.

Urinile normale conţin aproximativ 32 mg substanţe proteice la 100 ml urină (cantitate extrem de mică). Reactivii întrebuinţaţi în mod curent nu pot pune în evidenţă aceste cantităţi care de altfel, din punct de vedere practic, nu prezintă nici un interes.

Proteinuria poate varia de la cantităţi mici sub formă de urmă pînă la 50–60 g°/₀₀, valori întîlnite în unele cazuri de nefroză lipoidică.

Proteinele urinare în cea mai mare parte provin din proteinele sîngelui şi numai o foarte mică cantitate din proteinele celulelor renale distruse. Prin electroforeză s-au pus în evidenţă aceleaşi fracţiuni proteice în urină ca şi în plasmă. În urma acestor constatări, termenul de albuminurie este înlocuit cu termenul de proteinurie, propus de Wunderly şi Wuhrman. Proporţia de albumine depăşeşte globulinele; raportul albumine/globuline este peste 3.

Substanţele proteice care se găsesc în urină sînt de mai multe feluri: proteine adevărate care traduc o leziune sau tulburări funcţionale, proteine de transformare ca albumozele şi peptonele, care apar frecvent în urinele normale fără a avea semnificaţie semiologică, proteine aceto- şi termosolubile şi pseudoproteine ca mucina, substanţa mucoidă Mörner, albumina genitală şi altele.

Metodele curente pentru cercetarea proteinelor sînt bazate pe precipitarea lor prin agenţi chimici sau coagularea prin căldură; de aici rezultă anumite erori datorite precipitării şi altor componente, care pot falsifica rezultatele. Din punctul de vedere al sensibilităţii, metoda cu acid sulfosalicilic este preferabilă metodei Heller.

Determinarea se va face pe urină emisă proaspăt sau recoltată pe conservant. Bolnavul, după ce i se face toaleta, va urina în două vase: prima urină care conţine secreţia uretrală şi secreţia vezico-prostatică nu va fi utilizată, ci numai cea conţinută în al doilea vas va servi la cercetarea albuminei. Urina în care se determină proteina trebuie să fie clară, ceea ce se obţine prin centrifugare sau filtrare. În cazul cînd nu se clarifică astfel se vor adăuga la 100 ml urină, 5 g de talc purificat sau pămînt de infuzorii, se agită şi se filtrează. pH urinii trebuie să fie acid la turnesol, în caz contrar se va acidula cu acid acetic N/10 pînă la reacţia acidă; adăugarea de acid acetic împiedică precipitarea prin încălzire a fosfaţior şi carbonaţilor alcalinoteroşi.

Determinarea proteinelor poate fi eronată atunci cînd urina conţine sînge, puroi sau bacterii.

Dozarea calitativă a proteinelor

Metoda cu acid sulfo-salicilic. Se pun 3—4 ml urină clară într-o eprubetă şi se adaugă 8—10 picături de acid sulfo-salicilic 20%. Se agită uşor şi se lasă 10 minute în repaus, după care se compară cu proba martor care conţine numai aceeaşi cantitate de urină. După cantitatea prezentă de proteină apare o opalescenţă sau chiar un precipitat în tubul de cercetat. Dacă urina rămîne limpede, proteina este absentă.

Aceeaşi reacţie o dau şi albumozele, la care turbiditatea dispare prin încălzire, pe cînd cea dată de proteină se intensifică.

Metoda cu acid nitric-nitros. (*metoda Heller*) se bazează pe proprietatea acidului nitric-nitros de a precipita proteinele.

Reactiv nitric-nitros: acid nitric 100 ml; apă distilată 200 ml; nitrit de sodiu 0,06 g.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 5 ml urină şi cu o pipetă efilată se introduc la fundul eprubetei reactiv nitric-nitros, circa 2 ml, avînd grijă ca cele două lichide să nu se amestece.

Examinarea rezultatelor se face după 5 minute pe fond negru. Rezultatul este pozitiv dacă la limita lichidelor apare un inel de precipitare opalescent. Pseudoalbuminele dau şi ele un inel sau o opalescenţă deasupra liniei de separare.

Urinile bogate în acid uric sau uraţi dau inel de precipitare cu reactivul nitric-nitros deasupra liniei de separaţie a celor două lichide. Prin încălzire, inelul dispare. De asemenea, urinile bogate în uree dau un inel care dispare prin diluarea urinii.

Diferenţierea proteinelor adevărate de pseudoproteine.

Metoda cu acid citric. Este analogă determinării de mai sus, utilizîndu-se reactivul citric în locul celui nitric-nitros.

Reactiv: 100 g citrat trisodic în 70 ml apă distilată. Pot exista trei posibilităţi:

Urina conţine proteine şi pseudoproteine. În eprubeta cu reactiv citric se observă un inel la limita de separaţie. În eprubeta cu reactiv nitric-nitros se observă două inele, unul la limita de separţie — proteine — iar altul deasupra acestui nivel — pseudoproteina.

Urina nu conţine decît proteină. În eprubeta cu reactiv citric nu se observă nici un inel spre deosebire de eprubeta cu reactiv nitric-nitros, care dă inelul de separaţie a lichidelor.

Urina conţine pseudoproteine. Inelul la limita de separaţie apare numai în tubul cu reactiv citric.

Metoda prin căldură constă în încălzirea urinei într-o eprubetă la un bec Bunsen numai în partea superioară a eprubetei, pînă ce urina începe să fiarbă; urina din partea inferioară rămîne rece. Se scoate tubul din flacără şi se adaugă cu grijă cîteva picături de acid acetic 10% sau tricloracetic 20%.

Se compară partea de sus a eprubetei care a fost încălzită cu partea inferioară. Dacă după încălzire s-a produs o opalescenţă, care dispare după adaos de acid, aceasta se datoreşte fosfaţilor sau carbonaţilor. Dacă opalescenţa se menţine şi după adăugarea de acid, ea este datorită fie proteinei adevărate, fie mucinei, produşi lipsiţi de interes clinic. Mucina poate fi diferenţiată de proteina adevărată în modul următor: dacă se adaugă urinii la rece un exces de acid acetic 10% şi apare o opalescenţă, aceasta se datoreşte mucinei şi nu proteinei adevărate. După încălzire poate apărea o opalescenţă datorită proteinelor acetosolubile; adăugînd un exces de acid acetic 10% se dizolvă numai proteinele aceto-solubile, nu şi proteinele adevărate. În urinile sărace în cloruri, proteina nu coagulează prin căldură. Acest lucru se poate corecta cu 3—4 picături de clorură de sodiu 30%.

Diferențierea proteinelor de peptone

Cercetarea se face pe urină proaspătă. În cazul cînd urina conține urobilină se acidulează ușor cu acid sulfuric și se agită cu cloroform. Cloroformul este îndepărtat cu ajutorul unei pipete.

Identificarea peptonelor. La 10 ml urină filtrată se adaugă 8—10 g sulfat de sodiu cristalizat; se încălzește și se fierbe cîteva secunde. Se filtrează sau se centrifughează. Precipitatul obținut conține albumină și albumoză. Lichidul rămas poate conține peptone, ceea ce se verifică adăugînd la filtrat jumătate volum de hidroxid de sodiu concentrat și 1—2 picături de sulfat de cupru 1%, pentru reacția biuretului. În cazul pozitiv după agitare apare o colorație roșie-violetă.

Identificarea albumozelor. Precipitatul rămas de la identificarea peptonelor se tratează cu 5—8 ml alcool și se agită, se centrifughează și se decantează. Precipitatul se tratează din nou cu alcool și se procedează ca mai sus, adică se dizolvă în puțină apă distilată, se încălzește la fierbere și se filtrează. În filtrat se încearcă reacția biuretului, pentru a constata prezența albumozelor. Albumozele se întîlnesc mai des în boli infecțioase: scarlatină, gripă, difterie, febră tifoidă, rujeolă și altele.

Dozarea cantitativă a proteinelor

Metoda Esbach este metoda cea mai des utilizată.

Reactivi: 1. Reactiv Esbach: acid picric 10 g, acid citric 20 g, apă distilată *ad* 1 000 ml.

2. Clorură ferică 10%.

Tehnica. Urina acidă și cu densitatea care nu trece de 1,010, la nevoie diluată cu apă distilată și acidulată cu acid acetic 10%, se pune în eprubeta specială pînă la semnul *U*. Se adaugă reactiv Esbach pînă la semnul *R*, se agită bine și se lasă în repaus 24 de ore.

Se citește înălțimea precipitatului care dă în grame concentrația în proteină la litru. Se va ține seama de diluția făcută. Cînd concentrația în proteină este mai mare de 4 g/litru, urina trebuie să se dilueze cu apă distilată. Alături de proteine precipită și pseudoproteinele, urații, creatina și alcaloizii.

Modificări ale metodei Esbach. Se introduce urina pînă la semnul *U* și se adaugă 10 picături clorură ferică 10%. Se adaugă reactivul Esbach pînă la *R*. Se amestecă și se pune pe baia de apă la 72° cîteva minute, după care se poate citi rezultatul.

Metoda diluțiilor. Sensibilitatea metodei Heller este de 0,033 g albumină/litru. Prin diluarea urinii și cercetarea apariției inelului, metoda devine cantitativă.

Tehnica. Se diluează urina care conține proteină cu apă distilată în proporție de 1/5 și se adaugă 2 ml reactiv nitric-nitros, ca și la metoda calitativă.

Citirea se face după trei minute. Dacă inelul apare înainte de 3 minute se va mări diluția. Dacă apare după 3 minute, diluția se va micșora. Calculul se face înmulțind diluția cu 0,033, pentru a se obține cantitatea de proteină în grame la litru.

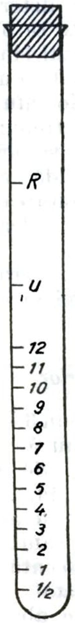


Fig. 107. — Albuminometrul Esbach.

Metoda gravimetrică. Se precipită la cald proteinele în prezența acidului tricloracetic, iar precipitatul se usucă și se cîntărește.

Tehnica. Într-un balon cotat de 100 ml se adaugă 50 ml urină filtrată, care să conțină în medie 0,10 g proteină/litru, se completează la 100 ml cu ser fiziologic. Diluția este trecută într-un pahar Berzelius și i se adaugă 18 ml reactiv acid tricloracetic 30%, se fierbe la baia de apă, agitînd vasul timp de 30 de minute, pînă ce toată albumina a coagulat; filtrăm prin două filtre tarate în prealabil la greutate constantă. Se spală paharul cu apă distilată clocotită pentru a antrena orice urmă de precipitat și se filtrează. Precipitatul se spală cu alcool și eter. Se ține la etuvă la 100° timp de 3—4 ore, pînă la uscarea completă. Răcirea se face la exsicator, după care se cîntărește.

Diferența dintre greutatea filtrului singur și a filtrului cu precipitat arată cantitatea de proteine la 50 ml urină. Se raportează apoi la 100 ml urină.

Proteine $g^{0}/_{00} = P \times 20$,

P = greutatea în grame a precipitatului.

Notă. Dacă urina conţine o cantitate mare de proteină, precipitarea poate fi incompletă şi se va lucra în acest caz cu urină diluată 1/10, ţinîndu-se seama de diluţie la calcul.

Determinarea proteinei Bence-Jones

Proteina Bence-Jones este caracterizată prin formarea unui precipitat cînd urina este încălzită la 50—60°. Ea dispare total sau parţial, cînd temperatura se apropie de punctul de fierbere şi reapare la răcire.

Tehnica. Într-un pahar Berzelius se introduce urina de cercetat şi un termometru. Se pune în baia de apă şi se încălzeşte foarte încet. Turbiditatea apare aproximativ la 40°, urmată de apariţia unui precipitat la temperatura aproximativă de 60°. Se acidulează cu cîteva picături de acid acetic 10% şi se ridică temperatura la fierbere. Precipitatul dispare parţial sau total. Dacă proteina Bence-Jones este prezentă, precipitatul va reapare la răcire. Urinele conţinînd proteină trebuie filtrate în apropierea punctului de fierbere şi apoi cercetate. Adăugarea cîtorva picături de clorură de calciu 1% favorizează reacţia. Dacă proba este pozitivă se întăreşte confirmarea rezultatului prin următoarele teste:

a) Precipitatul se tratează cu 5 ml acid nitric *N*. Precipitatul dispare prin fierbere şi reapare prin răcire.

b) Precipitatul se tratează cu 5 ml alcool etilic 16° şi se centrifughează imediat. Supernatantul se îndepărtează, iar precipitatul trebuie să se solubilizeze în apă.

Proteina Bence-Jones apare în urină într-un procentaj mare în cazuri de mieloame multiple şi anumite cazuri de osteosarcoame, osteomalacie carcinoame, metastaze ale măduvei şi în leucemie.

Determinarea corpilor birefringenţi

Corpii birefringenţi din urină sînt constituiţi din lipide; ei se pun în evidenţă la microscopul polarizant.

Tehnica. Se reglează nicolul din ocularul analizator, pentru a obţine extincţia completă a razelor luminoase. Se pune pe platină o lamă cu o picătură de urină şi se acoperă cu o lamelă. Se roteşte analizatorul şi în cazul prezenţei corpilor birefringenţi apare o cruce de Malta.

Determinarea unei proteinurii intermitente

Bolnavul va urina în 5 vase în următoarele perioade:

1. Dimineaţa, ora 8 (proba 1).
2. După 2 ore, ora 10 (proba 2).
3. Imediat după masă, bolnavul va urina şi această urină se aruncă. Va sta culcat 2 ore şi apoi va urina (proba 3).
4. După 2 ore de mers (proba 4).
5. După masa de seară va sta culcat 2 ore şi apoi va urina (proba 5). Toate probele vor fi cercetate cu reactiv nitric-nitros.

Rezultate:

Vasul 1	2	3	4	5	Natura proteinuriei
0	+	0	0	0	Proteină ortostatică matinală
0	0	0	+	0	Proteină ortostatică vesperală
0	+	0	+	0	Proteină ortostatică totală
0	0	+	(+)	0	Proteină digestivă
0	0	(+)	+	++	Proteină de efort
+	+	+	+	+	Proteină totală

De obicei, proteinuriile intermitente sînt mai mult funcţionale decît consecinţa unei leziuni.

O proteinurie adevărată arată o atingere a funcţiei glomerulare. Glomerulul lezat lasă să filtreze proteinele plasmatice. Toate proteinuriile importante indică un sindrom nefrotic şi necesită cercetarea unui dezechilibru lipoprotidic plasmatic.

Proteinuria poate apărea şi în stări febrile şi dispare după scăderea febrei. O proteinurie toxică se constată după intoxicaţia cu fenoli, fosfor, arsenic etc., după anumite boli infecţioase ca difterie, scarlatină, febră tifoidă şi după eforturi fizice cînd poate apărea o proteinurie trecătoare. La unii indivizi se constată o proteinurie alimentară după ingestia unei cantităţi mari de proteine. La nou-născut există o proteinurie cu un maxim pînă la a 3-a zi, apoi scade rămînînd urme care dispar în 2—3 săptămîni.

Prezenţa unei proteinurii nu indică neapărat o atingere a funcţiei renale, după cum nici lipsa proteinuriei nu asigură integritatea rinichiului.

Lipoiduria, care însoţeşte adesea proteinuriile mari, duce la formarea de globule de grăsime, care se prezintă la microscopul polarizant sub formă de cruce de Malta.

Cercetarea amoniacului în urină

Amoniacul se pune întîi în libertate prin adăugarea de carbonat de sodiu şi apoi prin distilare la 50°. Amoniacul este prins pe acid clorhidric. Cantitatea de acid rămasă se determină prin titrare cu o bază.

Reactivi : 1. Fenolftaleină 1% în alcool de 96°.

2. Hidrat de sodiu N/50.

3. Acid clorhidric N/50.

4. Carbonat de sodiu soluţie saturată.

Tehnica. Vasul *B* este pe jumătate umplut cu apă slab acidulată, pentru a reţine urmele de amoniac din atmosferă. Vasul *A* este prevăzut cu o mică pîlnioară prin care se pune urina, 5 ml soluţie de carbonat de sodiu şi 2—3 picături de fenolftaleină. Vasul *A* este aşezat în baia de apă la 40—50°. Vasul *C* conţine cantitatea fixă de acid clorhidric N/50 + 2—3 picături de colorant roşu de metil şi este legat de trompa de apă din aparatul de distilat.

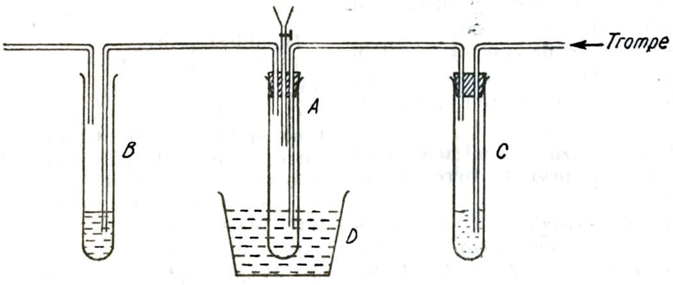


Fig. 108. — Determinarea amoniacului urinar (explicaţii în text).

Vasele sînt legate între ele cu tub de cauciuc. Din momentul în care s-au adăugat 5 ml soluţie de carbonat de sodiu peste 10 ml urină se închide perfect aparatul şi se dă drumul la trompa de apă. Din acel moment se aşteaptă 20 de minute şi apoi se opreşte distilarea.

Vasul *C*, care conţine 10 ml acid clorhidric N/50, se detaşează de aparat şi se titrează cu hidrat de sodiu N/50.

Cantitatea de hidrat de sodiu N/50 consumată se scade din 10 ml acid clorhidric N/50, iar diferenţa se înmulţeşte cu 3,4 pentru a obţine mg NH_3 la 100 ml urină.

Valori normale : 0,6—0,8 g NH_3 în urina de 24 de ore.

Dozarea amoniacului şi a aminoacizilor

Metoda cu formol (Sörensen-Ronchese). Urina neutralizată în prealabil prin tratare cu o soluţie neutră de formol devine acidă faţă de fenolftaleină. Acizii aminaţi în prezenţa formolului îşi pierd caracterul bazic, rămînînd cu funcţia carboxil, care se poate titra cu hidroxid de sodiu.

Reactivi : 1. Hidroxid de sodiu N/10.

2. Formol. Formolul este diluat cu apă distilată în cantităţi egale şi neutralizat cu hidroxid de sodiu N/10 în prezenţa fenolftaleinei.

3. Soluţie 1% fenolftaleină în alcool.

Tehnica. Într-un balon Erlenmeyer se măsoară 10 ml urină + 100 ml apă distilată, fiartă recent, la care se adaugă NaOH N/10 pînă la apariţia unei culori roz-pale, apoi se amestecă cu 20 ml soluţie de formol. Lichidul se decolorează prin punerea în libertate a acizilor care au fost combinaţi cu amoniacul. Se titrează cu NaOH N/10 pînă la apariţia unei culori roz-pal.

Calcul : 1 ml de hidroxid de sodiu N/10 = 1,76 mg NH_3.

g NH_3‰ ml urină = $n \times 0{,}176$

n = cantitatea de hidroxid de sodiu N/10 întrebuinţaţi la titrare.

Cu această metodă se dozează o dată cu NH_3 şi cantitatea de amino-acizi, ceea ce constituie eroarea metodei. Cu toate aceste erori, metoda fiind simplă prezintă un mare interes clinic.

Cantitatea de amoniac emisă în 24 de ore variază între 0,5 şi 1,2 g. Amoniacul urinar creşte în cursul diabetului paralel cu excreţia acizilor organici. În coma diabetică poate atinge pînă la 12 g amoniac în 24 de ore. În general, eliminarea de amoniac în urină crește mult în afecțiunile însoțite de acidoză. În leziunile renale, cantitatea de amoniac eliminat scade mult.

Dozarea ureei în urină

Ureea în urină se determină cu ureometrul Kowarski, după ce urina a fost diluată de 2 sau 4 ori. Diluția se face în raport cu densitatea și anume la densități sub 1 010 se diluează de două ori, iar la densități peste 1 010 se diluează de patru ori.

Urina diluată se amestecă în părți egale cu acid tricloracetic 10%, se agită și se filtrează. Mai departe se lucrează exact cum s-a arătat la dozarea ureei în sînge, metoda Kowarski.

Rezultatul obținut la dozare se va înmulți cu gradul diluției. La calcularea ureei în urină se va ține seamă și de cantitatea de urină din 24 de ore. Proba pe care se determină ureea este luată dintr-un amestec de urină colectat în 24 de ore.

Dozarea ureei cu metoda Kowarski nu este specifică, deoarece hipobromitul de sodiu pune în libertate și azotul sărurilor amoniacale, care se calculează tot ca azot ureic.

Pentru clinică, rezultatele sînt satisfăcătoare. Rezultate precise dau metodele cu dixantilureea, urează sau desacetilmonoximă descrise mai înainte și care pot fi aplicate și la dozarea ureei în urină.

În mod normal, omul adult elimină între 15—35 g uree în 24 de ore. Cantitatea de uree este foarte variabilă, în funcție de regimul alimentar. Eliminarea ureei în urină crește în procesele de catabolism protidic endogen. În diabet, eliminarea de azot este foarte crescută (90—115 g), iar hipoazoturia se constată în insuficiența hepatică sau cea renală din nefritele acute.

Dozarea acidului uric în urină

Acidul uric este precipitat sub formă de urat de amoniu, care este titrat cu o soluție de iod. Determinarea se face pe urina nefiltrată din 24 de ore.

Reactivi : 1. Amoniac concentrat.

2. Clorură de amoniu.

3. Acid acetic 10%.

4. Soluție saturată de borax.

5. Soluție saturată de bicarbonat de sodiu.

6. Iod N/10.

7. Amidon 1% în soluție de clorură de sodiu 9‰.

8. Soluție de amoniac-clorură de amoniu : 150 g clorură de amoniu în 500 ml apă distilată, se adaugă 150 ml amoniac concentrat și se completează volumul la 1 000 ml cu apă distilată.

Tehnica : Într-un balon Erlenmeyer se introduc 100 ml urină, 15 g clorură de amoniu, 15 ml amoniac concentrat. Se lasă minimum 30 de minute în contact. Se filtrează. Se spală precipitatul de 3 ori cu soluția amoniac-clorură de amoniu. Se desface filtrul cu precauție și se întinde într-un vas conic antrenînd precipitatul prin spălare cu circa 300 ml apă distilată. Se pune în pahar o bucățică de hîrtie de turnesol și se neutralizează amoniacul liber cu acid acetic 10% pînă la virarea în roșu a hîrtiei de turnesol. Se adaugă dintr-un amestec făcut extemporaneu din părți egale de borax și bicarbonat de sodiu, pînă cînd se produce o virare a hîrtiei de turnesol în albastru. Se încălzește amestecul, se titrează cu iod N/10, avînd ca indicator amidonul, pînă cînd lichidul capătă o colorație albastră persistentă circa 10—15 secunde. Nu se ține seama de o eventuală tentă roză, care poate apărea mai tîrziu.

Calcul : 1 ml soluție de iod N/10 corespunde la 0,0084 g acid uric/litru. Cantitatea de acid uric în grame la litru este egală cu numărul de ml iod N/10 întrebuințați la titrare, care se înmulțesc cu 0,084 și + 0,01. Cifra 0,01 este corecția de solubilitate. Cantitatea eliminată în 24 de ore este în medie de 0,80 g : în stări patologice, cantitatea poate fi crescută în special în bolile legate de distrugerea nucleului celular. În leucemii poate atinge pînă la 5 g. În diabetul zaharat, eliminarea de acid uric este scăzută.

Dozarea creatininei în urină

Creatinina formează cu acidul picric în soluție alcalină un produs de condensare roșu a cărei intensitate este proporțională cu cantitatea de creatinină.

Reactivi : 1. Soluție saturată de acid picric se dizolvă 1,2 g acid picric la cald în 100 ml apă distilată, 10 ml din această soluție, după adăugare a 1 ml NaOH 10% și aducere la 25 ml trebuie să nu dea timp de 15 minute nici o extincție cu filtrul S_{53}. Dacă este necesară o purificare, se recristalizează acidul picric în benzen și se usucă la vid.

2. Soluție NaOH 10%.

Tehnică. Se introduce cu pipeta 1 ml de urină clară într-un balon cotat de 100 ml și se adaugă 20 ml soluție acid picric (dacă urina de cercetat este tulbure, ea trebuie în prealabil centrifugată), apoi 1,5 ml NaOH 10% se amestecă bine și se lasă să stea 10 minute. Se aduce cu apă la semn, se omogenizează perfect și, după 5 minute, se examinează cu filtru S_{53}, cuva de 1 cm, avînd ca lichid de referință apa.

Calcul : $E \times 260 = mg\%$ creatinină.

Dozarea creatininei totale în urină

Reactivi : 1. Soluția acid picric (preparare ca la dozarea creatininei).

2. HCl N/1.

Tehnica. Într-un vas Erlenmeyer se încălzesc 10 ml urină cu 5 ml HCl N/1, 3 ore pe o baie de apă. Se filtrează într-un balon cotat de 25 ml și se aduce cu apă la semn. Din această soluție diluată se pipetează 1 ml într-un balon cotat de 100 ml și se procedează mai departe, după cum a fost arătat mai sus, la dozarea creatininei. Citirea se face cu filtru S_{53}, cuva 2 cm, lichid de preferință apa.

Calculul : $E \times 325 = mg\ \%$ creatinină totală.

Cercetarea indicanului în urină

20 ml urină + 5 ml soluție de acetat de plumb 10% se agită și se filtrează. La 10 ml filtrat se adaugă 1 ml soluție alcoolică de timol + 10 ml reactiv Obermeyer (0,5% clorură fenică în acid clorhidric concentrat.) După 15 minute se adaugă cîteva picături de cloroform, se agită și se citește prezența culorii roz-violetă. Intensitatea colorației crește în caz de indicanurie pronunțată, ajungînd la roșu-violet.

Valori crescute sînt găsite în insuficiențe renale — nefrite grave — în bolile intestinale și în formele cronice și grave de constipație. Dozarea indicanului în sînge are o mare valoare diagnostică; concentrația lui crește mai devreme decît concentrația azotului rezidual, constituind astfel un indiciu în diagnosticarea precoce a uremiei. După ingerarea de medicamente cu iod nu se recomandă determinarea indolului, căci dă o colorație nespecifică.

Dozarea acidului oxalic în urină

Acidul oxalic se precipită cu Cl_2Ca în mediul amoniacal sub formă de oxalat de calciu. Oxalatul de calciu este cules pe un filtru și calcinat, transformîndu-se în carbonat și hidroxid de calciu. Prin tratarea carbonatului de calciu cu acidul sulfuric se obține sulfatul de calciu care, înmulțit cu 0,9411, dă cantitatea de oxalat de calciu conținută în 500 ml urină.

Reactivi : 1. Clorură de calciu sicum 10 g în 100 ml apă.

2. Amoniac concentrat.

3. Acid clorhidric 5%.

4. Eter alcoolizat (300 ml eter + 9 ml alcool 96°).

5. Acid sulfuric concentrat.

6. Acid acetic concentrat.

7. Azotat de argint N/10.

Tehnica. Într-un balon de 1 000 ml se introduc 500 ml urină proaspătă + 10 ml soluție clorură de calciu + 5—6 ml amoniac concentrat, pînă la reacția net alcalină. Se lasă în repaus proba 12—20 de ore, în care timp tot acidul oxalic precipită sub formă de oxalat de calciu. Se filtrează printr-un filtru de hîrtie. Precipitatul se spală de două ori cu apă distilată. Se așază pîlnia cu filtru care conține precipitatul deasupra unei pîlnii de separare de 250 ml dizolvîndu-se precipitatul cu o cantitate minimă de HCl, obținîndu-se acidul oxalic.

Peste soluția clorhidrică din pîlnia de separare se toarnă 100 ml eter și se agită. Se separă soluția eterică. Soluția clorhidrică rămasă se tratează încă de două ori cu cîte 100 ml eter. Toată soluția eterică se adună într-un Erlenmeyer, se adaugă 1—2 ml apă distilată (pentru a evita formarea eterului oxalic) și se distilează pe o baie de nisip, pînă ce volumul se reduce la circa 5 ml; apoi se adaugă NH_3 pînă se obține o reacție slab alcalină, apoi se acidifică cu acid acetic și se adaugă un exces de Cl_2Ca (10—12 ml).

Se lasă 12 ore, în care timp acidul oxalic precipită cu oxalatul de calciu. Se filtrează precipitatul de oxalat de calciu pe un filtru cantitativ, se spală de mai multe ori cu apă bidistilată caldă, pînă ce apele de spălare nu mai precipită cu azotatul de Ag. Filtrul se usucă la etuvă și se calcinează în cuptor într-un creuzet mic tarat. Cenușa albă care se obține este compusă din CO_3Ca și $Ca(OH)_2$ care, tratată cu HCl şi cu un exces de SO_4H_2 concentrat, se transformă în sulfat de calciu (SO_4Ca).

Lichidul se evaporă, se calcinează creuzetul cu reziduu de SO_4Ca la roşu şi după ce se răceşte se cîntăreşte de cîteva ori pînă la greutatea constantă. Greutatea sulfatului de calciu înmulţită cu 0,9411 reprezintă cantitatea de oxalat de calciu, conţinută în 500 ml urină.

Calcul : g oxalat de calciu $‰$ ml urină $= P \times 0{,}9411 \times 2$

P = greutatea precipitatului.

$$0{,}9411 = \frac{128 \text{ greutatea moleculară } SO_4Ca}{136 \text{ greutatea moleculară } (COO)_2Ca}$$

Un individ sănătos elimină în 24 de ore pînă la 0,02 g oxalat de calciu; cantitatea fiind foarte mică se lucrează pe 500 ml urină proaspătă.

Creşterea acidului oxalic în urină se observă după întrebuinţarea unor alimente bogate în acid oxalic : carne în cantitate mare, spanac, măcriş, piper, ceai, cacao şi altele.

În unele boli, ca guta, obezitatea, se observă creşterea acidului oxalic, însoţită deseori de glicozurie.

Eliminarea exagerată a acidului oxalic prin rinichi poate produce calculi renali şi vezicali.

EXAMENUL MICROSCOPIC (sedimentul urinar)

Pentru cercetarea sedimentului se utilizează urină proaspătă la cel mult 6 ore de la emisie sau se recoltează pe un antiseptic şi se conservă la frigider 24 de ore. Dacă sedimentul este bogat se va lăsa urina în repaus într-un tub conic şi se va lua cu o pipetă sediment de la fund. Dacă este necesar, centrifugarea se va face timp de 3–6 minute cu 1 200–2 500 turaţii/min. În caz că sedimentul este în cantitate redusă se va îndepărta supernatantul şi se va adăuga o nouă cantitate de urină peste sediment şi se centrifughează din nou cu acelaşi număr de turaţii. Se evită centrifugările mai rapide, deoarece se produce o distrugere a elementelor figurate, în special a cilindrilor. După centrifugare se varsă urina din eprubetă şi se picură pe o lamă curată picăturile rămase pe fundul eprubetei. Lama se acoperă cu o lamelă, evitîndu-se formarea de bule de aer şi se examinează la microscop înainte de uscarea preparatului în lumină diafragmată (lumina prea puternică poate da erori).

Examenul microscopic al sedimentului urinar se face întîi cu obiectivul mic, pentru a stabili prezenţa cilindrilor, cristalelor şi a celulelor, apoi urmează studiul microscopic cu obiectivul mare. Sedimentul urinii poate fi colorat în alb, roşu-gri sau roşu-orange. Culoarea albă este dată de prezenţa fosfaţilor, carbonaţilor, oxalaţilor de calciu, a acidului uric, celulelor epiteliale, globulelor de puroi, celulelor rotunde cu protoplasmă granulată. Coloraţia sedimentului se face rareori cu albastru de metilen 1%, punînd o picătură de colorant peste sediment. Pentru diferenţierea elementelor celulare se întinde un frotiu care, după uscare, este colorat cu May-Grünwald-Giemsa.

Nu toate elementele organizate ale sedimentului sînt patologice, ele se pot găsi şi într-o urină normală. Numai atunci cînd se găsesc într-un număr mare pot fi interpretate ca patologice.

Celulele

Celulele epiteliale plate sînt mari, poliedrice, mai rar rotunde, au nucleu voluminos, protoplasma de culoare deschisă, fin granulată. La femei, ele sînt prezente în număr mai mare decît la bărbaţi şi provin din vagin. Dacă sînt foarte numeroase, ele provin din vezică şi indică inflamaţia căilor urinare inferioare. Dacă sînt puţin numeroase şi însoţite de filamente uretrale, ele provin din uretră.

Celulele rotunde, zise renale, sînt ovale sau poligonale mici, însă ceva mai mari decît leucocitele şi au un nucleu caracteristic, mare, rotund, veziculos, protoplasma granulară, adesea colorată în brun, care conţine picături de grăsime. Diferenţierea lor faţă de leucocite este uneori dificilă din cauză că leucocitele în urinile alcaline pot căpăta forma celulelor renale.

Celulele renale izolate nu se pot deosebi morfologic de alte celule epiteliale. Uneori apar în grămezi în formă de morulă. Ele traduc o inflamaţie cronică bazinetală.

Celulele cilindrice sînt mai mici decît celulele epiteliale şi au forma caracteristică.

Levurile sînt rotunde sau ovale, de mărimi inegale, des grupate, cîte două ori mai multe, nu au dublu contur.

Celulele tumorale. Prezenţa unui neoplasm poate fi suspectată, dacă urina conţine sînge şi mici aglomerări de celule mononucleare. Pot fi decelate uneori şi fragmente de ţesut tumoral, dacă sedimentul urinar este colorat cu albastru de metilen.

Leucocitele. Un număr mic de leucocite este prezent în urina normală. Provin din căile urinare și rinichi. Cînd numărul lor este foarte mult crescut formează puroiul și indică o inflamație a căilor urinare și o infecție renală. Leucocitele pot fi izolate, în grămezi sau înglobate în cilindri. Ele sînt intacte în urina acidă și deformate în urina alcalină. Nucleii sînt de obicei distincți sau acoperiți prin granulații. Adăugarea de 1—2 picături de acid acetic 10% aduce o clarificare. Adăugarea se va face cu atenție, căci acidul acetic lizează eritrocitele.

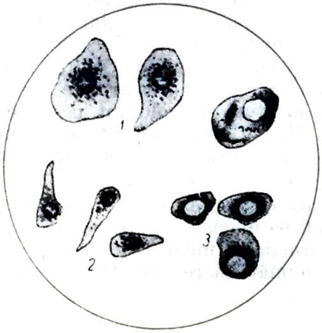


Fig. 109 A. — Sediment urinar.
1 — celulă epitelială plată; *2* — celulă în rachetă; *3* — celule renale și celule cu degenerescență vacuolară.

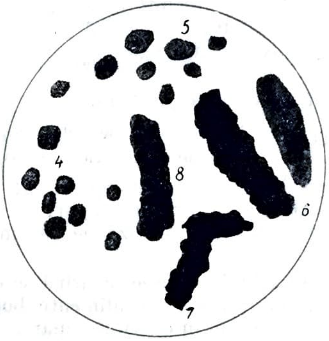


Fig. 109 B. — Sediment urinar.
4 — hematii; *5* — leucocite: *6* — cilindri hematici; *7* — cilindri leucocitari; *8* — cilindri epiteliali.

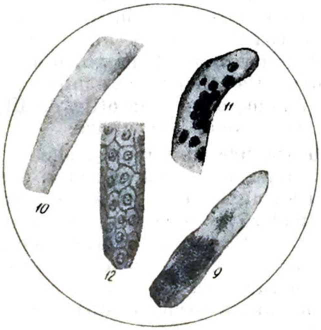


Fig. 109 C. — Sediment urinar.
9 — cilindri granuloși; *10* — cilindri hialini; *11* — cilindri hialini cu leucocite; *12* — cilindri hialini cu epitelii renale.

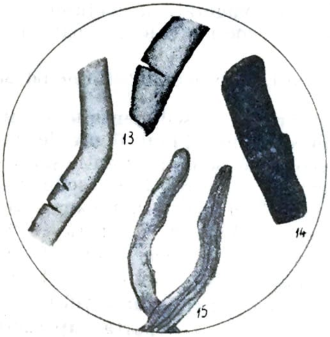


Fig. 109 D. — Sediment urinar.
13 — cilindri ceroși; *14* — cilindri grăsoși; *15* — cilindroizi.

Eritrocitele sînt rotunde, perfect conturate și se găsesc în număr foarte redus în urina normală; ele pot fi diferențiate de levuri, care sînt adesea sferice, prin faptul că, mișcînd viza micrometrică, hematiile apar cu contur dublu și sînt de culoare gălbuie, iar adăugarea de cîteva picături de acid acetic 10% le lizează imediat.

Cercetarea lor se va face pe o urină proaspătă. În urinile concentrate acide, ele se pot deforma devenind crenelate, iar în urinile alcaline se pot îmbiba, devenind rotunde. Prezența lor în cantitate mare în urină poate da o colorație roșiatică.

Testul pentru hemoragii oculte poate fi negativ, cînd sînt puţine hematii în urină, cam 10—15 pe cîmpul microscopic. Se va vedea dacă sîngele nu provine din căile genitale prin traumatism sau prin sondaj. Eritrocitele izolate se întîlnesc des după menstruaţie şi mai rar înaintea acesteia.

Prezenţa cilindrilor în sediment este de mare importanţă pentru diagnostic, deoarece pune în evidenţă un proces patologic în rinichi.

Cînd urina stă în repaus mai mult timp se poate produce o dizolvare a cilindrilor, mai ales în urinile alcaline. O centrifugare prea puternică produce de asemenea o distrugere a cilindrilor.

Cilindrii urinari

Alterarea peretelui tubilor urinari lasă să se acumuleze în lumenul lor exsudate proteice care se coagulează sub influenţa pH-ului acid al urinii, mai rar în urini alcaline, mulînd forma tubului unde a luat naştere şi apar în urină sub forma unor mase cilindrice alungite, de dimensiuni variabile, dar mari în raport cu celelalte elemente ale urinii. Cilindrii apar în aceleaşi condiţii ca şi proteinuria. Nu există însă nici un raport direct între proteinurie şi numărul cilindrilor. Există proteinurii intense fără cilindrurie concomitentă. Cilindrii se formează, după cum s-a arătat, în tubii renali alteraţi în diferite grade. Cilindrii hialini, granuloşi şi epiteliali reprezintă trei faze de gravitate crescîndă a unui proces patologic în tubii renali. Cilindrii hialini sînt un exsudat proteic, cilindrii granuloşi reprezintă de obicei o lezare superficială a celulelor renale, iar cilindrii epiteliali pot indica eliminarea celulelor renale. De aceea cînd găsim celule renale în urină se caută cu atenţie şi asemenea cilindri.

Cilindrii hialini sînt incolori şi omogeni, adesea fiind necesară colorarea cu albastru de metilen 1%. Uneori, pe suprafaţa lor se pot depune săruri simulînd cilindrii granuloşi. Cilindrii hialini apar în proteinurie, indicînd totdeauna existenţa unui proces patologic. Se întîlnesc în diferite tipuri de nefrite.

Cilindrii granuloşi sînt scurţi, friabili, formaţi din granulaţii fine. Sînt cei mai importanţi, apar în procese patologice renale grave, prezenţa lor indicînd o nefrită.

Cilindrii fibroşi prezintă aspect de reticuli speciali de fibrină de coloraţie gălbuie, de origine sanguină, ei indicînd existenţa unei congestii renale.

Cilindrii grăsoşi conţin picături de grăsime, se colorează în roşu puternic cu Sudan III. Sînt insolubili în acid acetic. Sursa picăturilor de grăsime este de obicei degenerescenţa grasă a celulelor epiteliale.

Cilindrii epiteliali. Existenţa lor este foarte rară. Ei conţin celule epiteliale din tubii renali. Adăugarea de acid acetic diluat 10% produce o clarificare a nucleilor.

Cilindrii hematici sînt formaţi din globule roşii cu elemente bine conservate sau uneori degenerate. Prezenţa lor dovedeşte că sîngele provine chiar din rinichi. Se întîlnesc în nefrita hemoragică acută, ei indicînd o glomerulonefrită.

Cilindrii leucocitari sînt formaţi din celule rotunde, mici şi granuloase. Cilindrii leucocitari puri se găsesc mai rar şi prezenţa lor denotă o pionefrită sau o pielonefrită. Mai des, leucocitele se depun pe cilindrii de mucus, hialini sau alţii.

Cilindrii comatoşi sînt formaţi din granule mici refringente, cu porţiuni hialine. Apar în coma diabetică sau înaintea ei.

Cilindrii ceroşi sînt un semn al unei leziuni grave a parenchimului renal, mai frecvent în procesele cronice decît în cele acute. Sînt formaţiuni omogene cu un luciu mat care îi deosebeşte de cilindrii hialini, sînt refringenţi cu marginile nete.

Cilindroizii nu trebuie confundaţi cu cilindrii hialini. Au transparenţa lor, dar au aspect de panglici sau filamente, mai aplatisaţi şi striaţi longitudinal. Au diametrul inegal, adesea fiind ramificaţi: traversează de obicei mai multe cîmpuri microscopice. Nu au semnificaţie patologică, putîndu-se găsi şi în urinile normale.

Pseudocilindrii pot fi de origine organică sau anorganică. Cei formaţi din săruri se pot confunda cu cei granuloşi. Prin încălzire se dizolvă cei de uraţi, iar prin adăugare de acid acetic, cei de fosfaţi; pseudocilindrii formaţi din grămezi de microbi se pot recunoaşte prin colorare bacteriologică.

Filamentele de mucus se prezintă ca nişte şuviţe lungi, semănînd cu cilindrii hialini, dar mai subţiri, asemenea unei panglici şi îngustate spre capete.

Elementele cristalizate (*săruri*)

În urina acidă se pot pune în evidență acidul uric, urații, oxalatul de calciu, cisteina.

În urina alcalină se pot constata, fosfatul amoniaco-magnezian, fosfatul bi- și tricalcic, carbonatul de calciu, uratul de amoniu. Unele din aceste cristale pot apărea și în urina neutră.

Acidul uric și urații. Dintre urați predomină uratul de sodiu. Toate urinile acide după un anumit timp de repaus, în special la rece, depun precipitate de urat. În cantitate mare produc o opalescență a urinii și o colorație galbenă-roșiatică. Prin încălzire se produce o clarificare. Urații se prezintă sub formă de granulații fine, iar acidul uric ca plăci rombice, cu colțurile teșite în forme de butoiașe, snopi, haltere, fier de lance de culoare galbenă. Adăugarea de hidroxizi alcalini produce solubilizarea lor. Se dizolvă și în amoniac cu formare de cristale de urat de amoniu. Sînt insolubili în acid acetic 10%.

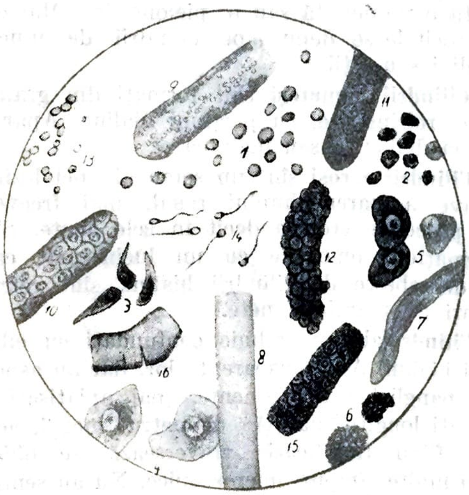


Fig. 110. — Sediment urinar.

1 — hematii; *2* — leucocite; *3* — celulă epitelială în rachetă; *4* — celule epiteliale plate; *5* — celule renale; *6* — leucocite cu degenerescență gravă; *7* — cilindroid; *8* — cilindri hialini; *9* — cilindri granuloși; *10* — cilindri hialini cu epitelii; *11* — cilindri hialini cu leucocite; *12* — cilindri leucocitari; *13* — levuri; *14* — spermatozoizi; *15* — cilindri hematici; *16* — cilindri ceroși.

Uratul de amoniu se găsește în urinile alcaline, la copii poate apărea și în urinile acide. Sub forma unor sfere simple sau unite, cu prelungiri radiale în formă de țepi colorate în galben-brun. Prin încălzire se produce dizolvarea lor și reapar prin răcire. Adăugarea de acid acetic sau acid clorhidric produce solubilizarea lor cu formare de cristale de acid uric.

Oxalatul de calciu este frecvent în urinile acide, în diabet, icter și după ingerare de alimente bogate în acid oxalic și se prezintă sub formă de cristale mici octoedrice incolore. Toate cristalele au aspectul unui plic de scrisoare. Ele nu se dizolvă în acid acetic, hidroxid de sodiu sau la căldură. Sînt ușor solubile în acid clorhidric concentrat, se recristalizează după adăugare de amoniac. În cantitate mare oxalatul de calciu imprimă sedimentului o culoare albă-cenușie.

Sulfatul de calciu se întîlnește foarte rar în sedimentul urinar și numai în urina puternic acidă. Se prezintă sub forma unor ace lungi și incolore sau sub formă de rozete. Sînt insolubile în acizi.

Carbonatul de calciu formează un depozit amorf sau cristalin de culoare albă-cenușie. Cristalele sînt solubile în acid acetic cu degajare de bioxid de carbon.

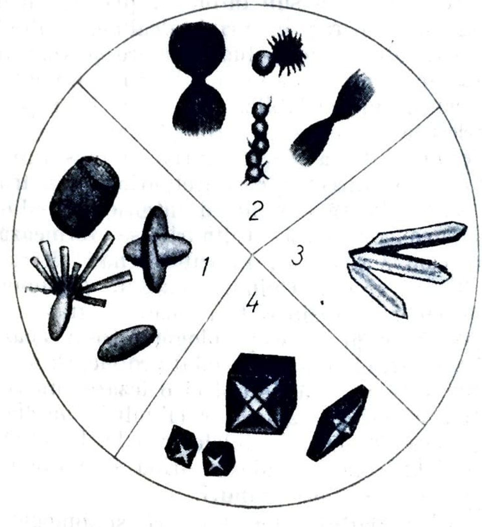


Fig. 111. — Sediment urinar-cristale.

1 — acid uric; *2* — urat de amoniu; *3* — acid hipuric; *4* — oxalat de calciu.

Fosfații amoniacomagnezieni sînt prezenți în urinile alcaline cu fermentație amoniacală. Fosfații aflați în cantitate mare în urină îi dau un aspect lăptos. Fosfații sînt solubili în acizi și insolubili în hidroxizii alcalini sau amoniac. Aceste cristale pot lua forma de capac de sicriu sau de frunze de ferigă.

Fosfații tricalcici se prezintă sub forma de granule amorfe de culoare albă-cenușie.

Fosfații bicalcici au formă de cristale aciculare, stelate sau în cruce.

Fosfații bazici de magneziu apar ca tablete rombice refringente.

Acidul hipuric se prezintă în prisme romboedrice incolore, insolubile în acid acetic, solubile în alcool.

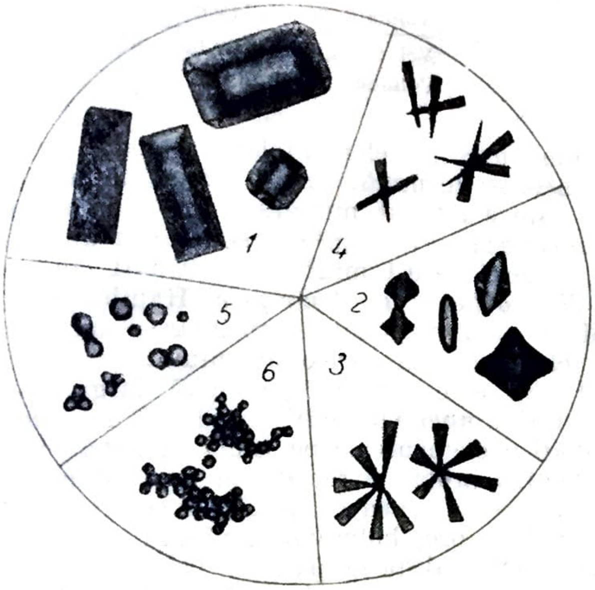


Fig. 112. — Sediment urinar — cristale.
1 – fosfat amoniaco-magnezian ; *2* – fosfat de magneziu ; *3* – fosfat de calciu ; *4* – sulfat de calciu ; *5* – carbonat de calciu ; *6* – fosfați teroși.

În sedimentul urinar se mai pot găsi filamente uretrale, spermatozoizi, paraziți, microbi. Elemente care apar exclusiv în cazuri patologice sînt :

Leucina și tirozina produse de clivaj ale proteinelor, se întîlnesc de obicei împreună în urini patologice ; leucina ca sfere galbene, concentric striate, insolubile în acid clorhidric sau eter, iar tirozina ca ace fine, negre, de obicei grupate stelar sau în snopi, insolubile în acid acetic sau eter, solubile în amoniac.

Cisteina apare sub formă de tablete hexagonale incolore, solubile în acid clorhidric și insolubile în acid acetic. Este un aminoacid rezultat din proteoliză.

Colesterolul se prezintă ca lamele incolore și transparente, adesea suprapuse, cu unghiuri retezate, solubile în cloroform și eter, insolubile în acizi și alcali.

Bilirubina are aspectul unor ace brune care se colorează în verde cu acidul azotic.

Examenul sedimentului colorat

Reactivi : 1. Soluție apoasă de eozină 0,5%.
2. Soluție-albastru de metilen-acid picric. 0,1 ml soluție albastru de metilen 1% + 10 ml soluție saturată de acid picric la care se adaugă 10 picături de glicerină.

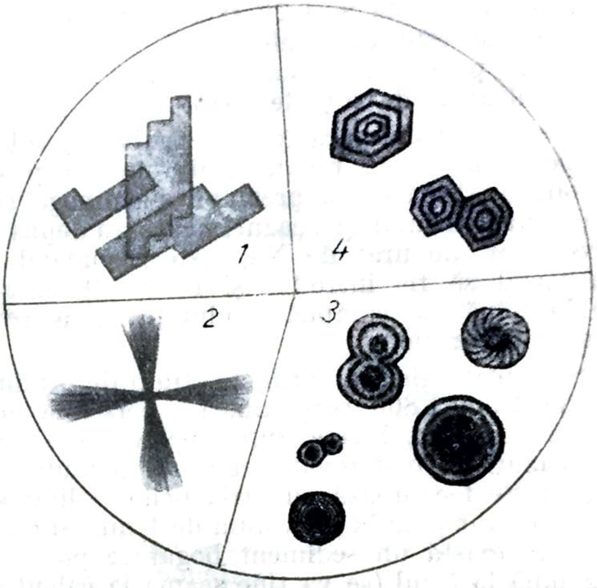


Fig. 113. — Sediment urinar — cristale.
1 – colesterol ; *2* – tirozină ; *3* – leucină ; *4* – cistină.

Tehnica. Urina proaspătă se centrifughează timp de 3-5 minute la 1 000-1 500 turații/min. ; se decantează supernatantul, iar precipitatului i se adaugă o picătură de soluție de eozină. Se agită și apoi se adaugă 2 picături din soluția de albastru de metilen-acid picric. Sedimentul are o culoare verde. Cilindrii hialini sînt colorați în albastru. Cilindrii granuloși devin mai caracteristici, granulațiile lor sînt colorate în portocaliu, galben și roșu.

Celulele epiteliale se colorează în roșu-galben, eritrocitele în roșu. Grăsimea nu se colorează.

Sedimentul colorat se poate acoperi cu o lamelă fixată cu balsam de Canada, conservîndu-se timp îndelungat.

Metoda dă indicații prețioase asupra evoluției, prognosticului și tratamentului în numeroase boli ale aparatului urinar.

Numărătoarea elementelor patologice urinare

— *metoda Addis* se determină pe urina din 12 — 24 de ore ;

— *metoda Hamburger* stabileşte eliminarea elementelor patologice pe minut.

Metoda Addis. Bolnavul va fi supus unui regim alimentar obişnuit din care se reduce timp de 24 de ore cantitatea de lichide ingerate.

Urina se colectează în vase separate şi perfect curate între orele 8 şi 20 şi 20 şi 8 a doua zi. La femeie este de preferat ca recoltarea să se facă prin cateterism. Se măsoară exact volumul urinii de zi şi de noapte.

Tehnica se măsoară într-o eprubetă gradată de centrifugare 10 ml urină din fiecare probă recoltată, după ce în prealabil s-a omogenizat conţinutul vasului. (În cazul în care s-a depus un precipitat de urat de Na, este recomandabil ca vasul să fie introdus şi menţinut în apă caldă pînă la completa solubilizare a sedimentului uratic.)

Se centrifughează eprubeta, timp de 5 minute, la 1 500-1 800 ture/min. La persoane normale, sedimentul este aproximativ de 0,2 ml (în cazuri de boli renale, el poate fi mult mai mare). Se decantează cu grijă lichidul limpede supernatant pînă la un volum de 1 ml. În cazul în care există un sediment bogat se pot păstra pînă la 5 ml (se va ţine seama la calcul de volumul în care s-a omogenizat sedimentul). După decantare se omogenizează conţinutul eprubetei cu multă grijă, iar cu pipeta Pasteur efilată se scoate o picătură care se introduce în celula de numărat. Se foloseşte procedeul întrebuinţat la numărătoarea elementelor sanguine. Pentru sedimentele bogate se întrebuinţează lama Bürker; pentru cele sărace, lama Fuchs-Rosenthal.

După 5-10 minute de repaus se procedează la numărătoare.

Cilindrii se numără cu obiectivul 10 × (3) pe întreaga suprafaţă a celulei (9 mm^2).

Eritrocitele şi leucocitele se numără cu obiectivul 40 × 60 × (6-7) pe o suprafaţă de 1 mm^2.

Calcul. Camera de numărătoare are o adîncime de 0,1 mm, iar volumul întregii camere este de 0,9 mm^3 sau 0,0009 cm^3.

Să presupunem că am găsit 180 de hematii la un volum de 0,0009 cm^3, iar volumul de urină în care s-a concentrat sedimentul a fost de 1 cm^3.

Numărul hematiilor din 10 ml = 180 × $\times \frac{1}{0{,}000\,9} = 200\,000.$

Dacă bolnavul a eliminat în 12 ore 200 ml urină, numărul de eritrocite (real eliminate în timpul respectiv) va fi:

$$\frac{200\,000}{10} \times 200 = 4\,000\,000.$$

Formula generală pentru calcularea numărului de hematii eliminate în 12 ore este:

$$\text{12 ore elim.} = \frac{\text{Volumul în ml, la care s-a redus urina}}{\text{Vol. în ml, în care s-a făcut numărătoarea}} \times$$
$$\times \frac{\text{Volumul urinii din 12 ore}}{\text{10 ml}}.$$

Pentru restul elementelor patologice se aplică aceeaşi formulă, ţinînd seama de suprafaţa pe care s-a făcut numărătoarea şi la volumul corespunzător (1 mm^2 corespunde la un volum al camerei de 0,1 mm^3 sau 0,000 01 cm^3).

Metoda Hamburger. Hamburger consideră mai raţională exprimarea numărului de elemente patologice pe minut.

Proba este folosită pe scară largă, avînd avantajul unei efectuări rapide şi unei determinări a elementelor pe urina proaspăt emisă.

Pentru probă se recoltează urina dimineaţa, prima emisie se aruncă, apoi se recoltează urina timp de 3 ore, bolnavul rămînînd tot timpul examinării culcat la pat.

Tehnica. Se numără 4 cîmpuri de 1 mm^2 şi se face media între ele.

Calcul. În calcul se ţine seama de:

— numărul de elemente eliminate pe ml de urină;

— stabilirea debitului urinar pe minut.

De exemplu: bolnavul a emis în 180 de minute un volum de 120 ml urină. Din acest volum s-au centrifugat 10 ml la 2 000 de turaţii/min. Sedimentul obţinut s-a omogenizat într-un volum de 1 ml.

$$\left.\begin{array}{ll} & 1\ \text{mm}^2 - 2\ \text{elem.}\\ \text{Numărătoarea} & 1\ \text{mm}^2 - 2\ \text{,,}\\ \text{pe celula} & 1\ \text{mm}^2 - 1\ \text{,,}\\ \text{Büker} & 1\ \text{mm}^2 - 1\ \text{,,}\end{array}\right\}\ \begin{array}{c}\text{Media}\\ 1{,}5\\ \text{elemente}\end{array}$$

Pentru calcularea numărului de elemente eliminate pe ml urină se înmulţeşte cifra cu 1 000.

1000 × 1,5 = 1 500 hematii/ml urină.

Diureza pe minut = 120 :180 = 0,66 ml.

Hematii eliminate = 1 500 × 0,66 = 990 elemente.

Valori fiziologice normale. Numărul de elemente figurate urinare calculate după metoda Addis este:

la adult:

— eritrocite pînă la 500 000;

— leucocite între 1 000 000 şi 1 800 000;

— cilindri pînă la 5 000.

la copii:

— eritrocite pînă la 450 000;

— leucocite 9 000—720 000;

— cilindri 0—6 500.

În proba eliminării pe minut, cifrele sînt:

— cilindri 1—2, cu o toleranţă maximă de 7 elemente;

— eritrocite 100 la 1 000. Cifra poate creşte în anumite stări febrile şi la femeie în perioada menstruaţiei. În aceste condiţii s-au găsit valori pînă la 10 000 hematii/min., leucocite/min. 1 000—5 000.

Variaţii patologice. Elementele celulare şi cilindrii care se elimină în diferitele afecţiuni renale prezintă următoarele valori:

În glomeruloneferita acută găsim:

— *hematii* între 200 000 şi 2 000 000 şi chiar 3 milioane;

— *cilindri*: 75—350.

În leziunile tubulare întinse, numărul cilindrilor poate atinge cifra de 1 400/min.

Aprecierea vindecării se face după scăderea numărului de elemente. Hematiile scad sub 1 000 de elemente/min., iar cilindrii tind să revină la normal.

În glomerulonefrita cronică cu albuminurie latentă:

— *numărul hematiilor* se găseşte între 500 şi 40 000;

— *cilindrii* între 400 şi 600 elemente/ min.

În sindromul nefrotic:

— *hematii* între 4 000 şi 80 000; în medie 27 000.

Amiloidoza renală. Se elimină aproximativ 7 500 elemente/min.

Pielonefrite şi pielocistite. Cercetarea numărului leucocitelor din sediment este de un real folos pentru urmărirea evoluţiei bolii şi eficacităţii tratamentului.

Tuberculoza renală. Stabilirea numărului de leucocite eliminate pe minut este o excelentă metodă pentru controlul evoluţiei bolii. Este necesar să se excludă posibilitatea existenţei unei infecţii urogenitale supraadăugate.

Concluzii. Pentru ca numărătoarea să aibă o valoare clinică reală se cere:

— să se repete examenele de urină la intervale regulate, iar determinarea cantitativă să fie cît mai exactă;

— să se ţină seama de faptul că elementele figurate pot avea o origine pielouretrală (şi este greu de stabilit dacă au această origine). În aprecierea unui sindrom renal să se ţină seama, în afară de existenţa hematiilor şi leucocitelor, de existenţa cilindrilor;

— să se coroboreze datele de laborator cu cele clinice.

Analiza chimică a calculilor urinari

Examenul constă în identificarea carbonaţilor, fosfaţilor, oxalaţilor, uraţilor, acidului uric, calciului, amoniacului şi cistinei. Analiza chimică se face pe calculi sfărîmaţi pînă în stadiul de pulbere.

Pentru o orientare rapidă asupra calculilor se aplică *metoda I*: 0,1—0,2 g calcul transformat în pulbere + 2 ml H_2O + 0,5 ml ClH concentrat D= 1,19 se încălzeşte la fierbere. În această fază sînt două posibilităţi:

1. *Nu se dizolvă.* Calculul este format din acid uric şi uraţi (pentru control se face reacţia murexidului, care constă în tratarea cu hidrat de sodiu a calculilor rămaşi nedizolvaţi în acid clorhidric). Culoarea albastră-violet denotă prezenţa acidului uric şi a uraţilor.

2. *Se dizolvă.* În acest caz se adaugă NH_4OH.

a) Dacă nu se formează un precipitat calculul conţine carbonaţi.

b) Dacă precipită, se adaugă acid acetic. În caz de dizolvare, calculul a fost format din fosfaţi, în caz că nu se dizolvă calculul a fost din oxalaţi.

Pentru un rezultat complet se aplică metoda a II-a.

Reactivi: 1. Acid azotic concentrat.
2. Hidroxid de sodiu 40%.
3. Acetat de sodiu 25%.
4. Oxalat de amoniu soluţie saturată.
5. Fosfat de sodiu soluţie saturată.
6. Iodură de potasiu 10%.
7. Hipoclorit de sodiu.
8. Reactivul molibdic: 15 g molibdat de amoniu + 100 ml apă distilată; după dizolvare se adaugă 100 ml acid azotic concentrat.

Tehnica. Examenul macroscopic: culoarea brună-roşcată indică prezenţa acidului uric şi a uraţilor; culoarea albă pămîntie, prezenţa fosfaţilor de calciu sau a magneziului, iar culoarea albă şi aspectul cristalin, prezenţa fosfaţilor amoniaco-magnezieni. În cazul cînd calculii sînt foarte tari, cu aspect de mură şi au o culoare neagră-verzuie, prezenţa oxalatului de calciu este sigură. Dacă calculul este translucid ceros şi de culoare galbenă, avînd în secţiune o structură radiară, se poate afirma prezenţa cistinei. Calculul format din cistină este solubil în acid clorhidric şi amoniac, iar pus pe o lamă de platină deasupra flăcării el arde fără să se topească, transformîndu-se într-o masă voluminoasă de cărbune.

Examenul chimic. Pe o mică porţiune din pulberea obţinută prin mojararea calculului se adaugă 2 picături de acid azotic şi se evaporă pe flacără mică. Dacă reziduul se colorează în albastru-violet sub acţiunea hidroxidului de sodiu (*reacţia murexidului*) *se pune în evidenţă prezenţa acidului uric sau a uraţilor în calcul.*

La o altă porţiune de pulbere se adaugă 2 picături de acid azotic şi 2 picături de apă distilată. Se încălzeşte pînă la fierbere, se diluează apoi cu 3 ml apă distilată. Din soluţia astfel obţinută se ia 1 ml căruia i se adaugă 3 ml de reactiv molibdenic şi se încălzeşte uşor. Obţinerea unui *precipitat galben* indică *prezenţa fosforului.* La restul soluţiei se adaugă o cantitate egală de acetat de sodiu 25%, se încălzeşte pînă la fierbere. Se adaugă apoi un exces de soluţie de oxalat de amoniu, iar în prezenţa *calciului* se obţine un precipitat.

Se filtrează, se alcalinizează filtratul cu amoniac, se adaugă o soluţie saturată de fosfat de sodiu. În prezenţa magneziului precipită fosfatul amoniacomagnezian cristalin.

Un fragment de calcul plus 2 picături de hidroxid de sodiu se încălzesc pînă la dizolvare, într-o eprubetă. Se diluează cu apă la 100 ml. Se adaugă 1 ml de iodură de potasiu 10% şi, picătură cu picătură, soluţia de hipoclorit de sodiu. În exces un precipitat negru indică prezenţa amoniacului.

Cînd calculul este foarte tare şi negru-verzui, cu aspect de mură, se dizolvă un fragment într-o cantitate foarte mică de acid azotic diluat 1/20. Se adaugă un exces de acetat de sodiu 25%; dacă se formează un precipitat, denotă prezenţa oxalatului de calciu.

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A EPURĂRII PLASMATICE

Prin desfăşurarea normală a funcţiei de excreţie, rinichiul execută o continuă epurare a plasmei de deşeurile metabolice. Procesul începe printr-o filtrare abundentă la nivelul capilarelor glomerulare care transportă 120–140 ml plasmă pe minut în lumenul tubular, unde începe procesul de prelucrare a plasmei filtrate. Rezultatul activităţii tubilor este reîntoarcerea în mediul intern a diferitelor substanţe proporţional cu nevoile menţinerii homeostaziei organismului. Acest proces include două activităţi: o reabsorbţie tubulară şi o secreţie activă.

Măsurarea eficienţei rinichiului în depurarea organismului de o substanţă dată se face prin determinarea *clearance*-ului renal al substanţei respective după formula:

$$C_x = \frac{U_x \times V}{P_x}$$

C_x = *clearance*-ul substanţei X;
U_x = concentraţia substanţei X în urină;
V = debitul urinar pe minut;
P_x = concentraţia substanţei X în plasmă.

Se urmăresc *clearance*-urile a două categorii mari de substanţe.

A. Substanţe ce nu se resorb şi nu se secretă. *Clearance*-ul acestor substanţe reprezintă filtratul glomerular.

B. Substanţe ce sînt depurate complet, al căror *clearance* reprezintă fluxul plasmatic renal.

În cele ce urmează, dăm metodele de lucru — pentru executarea diferitelor *clearance*-uri.

A. **Măsurarea filtratului glomerular.** Se face prin determinarea *clearance*-ului pentru:
— inulină;
— manitol;
— tiosulfat;
— creatinină endogenă.

Clearance-ul *inulinei*

Se administrează 5 g inulină i.v. şi se dozează cantitatea de inulină eliminată prin urină şi cea prezentă în sînge după 2 ore.

Tehnica recoltării. În timpul testului, bolnavul stă la pat în repaus total. Dimineaţa i se dă un mic dejun compus dintr-o bucată de pîine cu unt şi un pahar cu lapte, iar după o oră i se dă să bea un litru de apă sau ceai diluat. Pînă la sfîrşitul probei, bolnavul primeşte, din jumătate în jumătate de oră, cîte 200 ml apă. La 2 ore după ingerarea apei sau ceaiului se recoltează o probă-martor de urină şi de sînge. Sîngele se recoltează pe oxalat. După recoltarea probelor se injectează încet, intravenos, 100 ml soluţie de inulină 5%, în 10 minute. Se notează exact momentul terminării injecţiei. La o oră după aceasta, bolnavul trebuie să urineze, iar urina se aruncă. Dacă în vezică a rămas o cantitate de urină, ea trebuie scoasă cu sonda. Se recoltează apoi urina de două ori în perioade de cîte o oră. Recoltarea se face prin micţiune sau pentru mai multă siguranţă prin cateterism. Se notează precis volumul urinii eliminate. După 30 şi 90 de minute de la golirea vezicii, adică la mijlocul fiecărei perioade de recoltare a urinii, se recoltează sînge pe oxalat, se centrifughează rapid şi se separă plasma. Efectuarea probei în perioade mai scurte de 15—20 de minute înlătură eroarea produsă prin scăderea concentraţiei plasmatice a substanţei, eroare care are numai valoare teoretică.

Dozarea inulinei prin metoda cu rezorcină. Fructoza produsă prin hidroliza inulinei dă cu rezorcina un compus de culoare galbenă-roşie, a cărei intensitate este proporţională cu concentraţia inulinei.

Reactivi : 1. Soluţie rezorcină : 0,1 g rezorcină şi 0,25 g tiouree se dizolvă în 100 ml acid acetic.

2. Soluţie 10% $SO_4Zn.\ 7\ H_2O$.

3. Soluţie de hidroxid de sodiu N/2.

4. Acid clorhidric 30%.

5. Soluţie standard de inulină 2 mg%.

Tehnica. Determinarea inulinei în plasmă. Se pun într-o eprubetă 3 ml plasmă, 6 ml $ZnSO_4$, 6 ml NaOH şi 15 ml apă distilată. Amestecul se agită bine, se lasă în repaus timp de 10 minute şi se filtrează. La 2 ml filtrat, care corespunde la 0,2 ml plasmă se adaugă 1 ml reactiv rezorcină şi 7 ml acid clorhidric 30%. Se agită bine şi se lasă timp de 10 minute într-o baie de apă la 80°, în care timp apare culoarea, în cazul reacţiei pozitive. După răcire, timp de 30 minute, se fotometrează proba cu filtrul S_{53} şi cuva de 1 mm, faţă de apă.

Calcularea concentraţiei de inulină în mg% se face prin curba-etalon obţinută printr-o serie de diluţii cu concentraţii cunoscute.

Determinarea inulinei în urină. Urinile se diluează de 500—1 000 de ori. Din aceste diluţii se iau cîte 2 ml şi se procedează ca la metoda de determinare a inulinei în plasmă. Dacă urina conţine albumină, se recomandă o deproteinizare prealabilă.

Avînd concentraţiile de inulină în sînge şi urină, se face calculul coeficientului de epuraţie a inulinei după formula generală : $C = UV/P$.

U = cantitatea de inulină din urină în mg%.

V = cantitatea de urină eliminată într-un minut.

P = cantitatea de inulină din plasmă în mg%.

Valorile normale ale acestui coeficient de epuraţie pentru persoanele adulte sînt între 100 şi 130 ml/min. în medie 120 ml/min.

Dozarea inulinei prin metoda Hamm. Proba cu inulină este din punct de vedere tehnic, o metodă greoaie; de aceea în clinici se utilizează pentru orientare metoda Hamm, în care inulina eliminată se determină numai în urină.

Tehnica recoltării. La ora 7 se goleşte vezica, se aruncă urina. Bolnavul bea 250 ml ceai slab neîndulcit. La ora 7 şi 5 minute i se face o injecţie i. v. cu 5 g inulină, dizolvate în 50 ml ser fiziologic. La ora 9 şi 5 minute se goleşte complet vezica şi se măsoară exact cantitatea de urină.

În urina recoltată se determină cantitatea de inulină prin metodele de mai sus sau polarimetric.

Dozarea inulinei prin metoda polarimetrică. Inulina deviază planul luminii polarizate spre stînga.

Tehnica recoltării. Probele de urină, adică urina-martor şi urina-probă, după după 2 ore de la administrarea inulinei, se deproteinizează cu acetat de plumb şi se filtrează. Se examinează polarimetric.

Calcul. Concentraţia % $= \dfrac{100 \times A}{D \times l}$

D = deviaţia specifică medie a inulinei;

A = indicele polarimetric citit în grade;

l = lungimea tubului polarimetric.

Cantitatea de inulină eliminată în g în 2 ore =

$$= \frac{\text{concentraţia inulinei \%} \times \text{cantitatea de urină}}{100}$$

La urinile care conţin glucoză, deviaţia spre dreapta găsită în urina-martor trebuie adăugată la deviaţia probei.

La urinile care conţin albumină, deviaţia spre stînga, găsită în urina-martor, se scade din deviaţia probei.

Probele pentru determinarea inulinei trebuie făcute imediat după recoltare, deoarece, lăsate mult timp, se produce o scindare enzimatică a inulinei cu mărirea deviaţiei specifice spre stînga.

Clearance-*ul manitolului*

Metoda prin administrarea intravenoasă unică. În cursul probei, bolnavul rămîne culcat, recoltarea urinii făcîndu-se dimineaţa pe nemîncate. Se recoltează o probă de sînge pe fluorură de sodiu şi o probă de urină.

Imediat se injectează intravenos 50 ml soluţie de manitol 20 g% şi se dă bolnavului să bea 300 ml apă. După 30 de minute de la injecţie se goleşte vezica bolnavului şi urina este aruncată. Se administrează încă 300 ml apă. La 40 şi 60 de minute de la injecţia intravenoasă de manitol se face o a doua recoltare de sînge. La 50 şi 70 de minute se evacuează vezica şi se măsoară precis urina.

Determinarea manitolului : *Reactivi* : 1. Sulfat de cadmiu 34,7 g sînt dizolvate în 170 ml acid sulfuric N şi completat cu apă distilată pînă la 1 000 ml.

2. Hidroxid de sodiu N.

3. Soluţie de acid periodic: 4 g periodat de potasiu pur dizolvate în 1 000 ml acid sulfuric 16%. Se păstrează la întuneric.

4. Soluţie de clorură stanoasă 23,5 g dizolvate în 2,5 ml acid clorhidric concentrat. Densitatea = 1,17 şi completat cu apă 100 ml. Soluţia este stabilă timp de o săptămînă.

5. Reactiv cromotropic. Se prepară extemporaneu, amestecînd soluţia A cu soluţia B. Soluţia A conţine 5 g acid cromotropic (acid 1,8-dihidrooxinaftalin-3,6-disulfonic) dizolvate în 100 ml. Soluţia B conţine acid sulfuric 96,6 ‰.

6. Soluţia-etalon conţine 100 g manitol pe ml.

Tehnica. Se centrifughează sîngele recoltat pe fluorură de sodiu. La 2 ml plasmă se adaugă, pe rînd, 20 ml apă distilată, 6 ml soluţie acidă de sulfat de cadmiu şi 2 ml hidroxid de sodiu N/1; se lasă să stea timp de 10 minute, apoi se centrifughează la o viteză mare. Se ia cu pipeta 1 ml din supernatant şi se adaugă 0,5 ml soluţie acid periodic, se lasă 10 minute, după care se adaugă 0,5 ml soluţie de clorură stanoasă; se agită. În cazul unei cencentraţii mai mici de manitol, se produce o coloraţie galbenă; dacă manitolul este în concentraţie mare se produce o precipitare a oxizilor de staniu. Se adaugă apoi 5 ml reactiv cromotropic, se agită şi se ţine amestecul într-o baie de apă la 100°, timp de 30 de minute. După răcire se examinează la fotometru cu filtru verde intensitatea coloraţiei roşie-purpurie.

Dozarea manitolului în urină. Se face la fel ca în sînge, urina se diluează 1 ‰, fără a se deproteiniza.

Extincţiile găsite pentru proba plasmă şi proba urină sînt raportate pe curba-etalon.

Calculul coeficientului de epuraţie se face după formula

$$C = UV/P$$

Valori normale: 120—130 ml/min.

Clearance-*ul tiosulfatului de sodiu*

Principiul constă în dozarea iodometrică a concentraţiei tiosulfatului de sodiu în sînge şi urină la anumite intervale, după administrarea intravenoasă a unei soluţii de tiosulfat de sodiu.

Reactivi : 1. Soluţie sterilă de tiosulfat de sodiu 10% cu pH de 7,2 (pH se ajustează cu NaOH/N).

2. Wolframat de sodiu 2/3 N.

3. Acid sulfuric 2/3 N.

4. Iodat de potasiu N/100.

5. Acid clorhidric 2 N.

6. Iodura de potasiu 10%. Se prepară extemporaneu.

7. Amidon 1%.

8. Tiosulfat de sodiu N/100. Se prepară proaspăt.

9. Fenolftaleina 1% soluţie alcoolică.

10. Hidroxid de sodiu N.

Tehnica. La ora 8 dimineaţa, bolnavul ingerează pe nemîncate 500—1 000 ml apă distilată sau ceai, în timp de 30 minute. În tot timpul probei, el va sta la pat. La ora 9 se introduce o sondă uretrală în vezică şi se recoltează toată cantitatea de urină, din care se reţin 20—30 ml (proba-martor), se notează cu U_0, iar restul se aruncă. Deoarece recoltarea urinii se face în mod continuu, sonda rămîne în vezică. La ora $9^{5'}$ se recoltează 10 ml sînge pe oxalat de sodiu, notînd această probă-martor cu P_0, apoi se injectează 0,2 g/kilocorp tiosulfat de sodiu soluţie 10%. La un bolnav de 60 kg se vor injecta 120 ml soluţie de tiosulfat. Urina recoltată pînă la $9^{30'}$ se aruncă. La ora $9^{45'}$ se recoltează 10 ml sînge pe oxalat de sodiu, notînd această probă cu P_1 iar la ora 10 se recoltează în mod riguros urina U_1 şi i se măsoară volumul V_1. Dacă este necesar, se continuă proba încă o perioadă de 30 de minute, recoltînd 10 ml sînge (P_2) la ora $10^{15'}$ şi toată urina la $10^{30'}$, notînd proba cu U_2, iar volumul cu V_2.

Dozarea tiosulfatului în plasmă. Se centrifughează probele de sînge P_0, P_1 şi P_2 şi se iau cîte 2 ml plasmă limpede la care se adaugă 14 ml apă distilată, 2 ml wolframat de sodiu 2/3 N şi 2 ml acid sulfuric 2/3N. Se agită bine, se lasă în repaus timp de 5 minute, apoi se filtrează sau se centrifughează. Din filtratul clar se iau 10 ml, la care se adaugă 10 ml iodat de potasiu N/100 şi 2 ml acid clorhidric 2 N, iar după 5 minute 2 ml iodură de potasiu 10% şi 2—3 picături de amidon 1%. Se titrează apoi cele 3 probe P_0, P_1 şi P_2 cu tiosulfat de sodiu $N/100$ pînă la dispariţia culorii albastre, notînd numărul de ml tiosulfat N/100 folosiţi pentru fiecare probă.

Dozarea tiosulfatului în urină. Se iau 5—10 ml din fiecare probă de urină U_0, U_1 şi U_2 şi se alcalinizează cu 1—2 picături de soluţie NaOH/n, folosind ca indicator fenolftaleina. Se adaugă la fiecare probă 25 ml iodat de potasiu N/100 + 2 ml ClH 2N + 2 ml iodură de potasiu 10% şi 2—3 picături amidon. Dacă nu apare culoarea albastră, deci iodul nu s-a degajat, se mai adaugă încă 25 ml iodat de potasiu N/100 şi apoi se titrează cu tiosulfat de sodiu N/100 pînă la dispariţia culorii albastre, ţinînd seama la calcule de această adăugare. Se notează numărul de ml de tiosulfat folosiţi pentru fiecare probă.

Calcul. Coeficientul de epuraţie $C = \frac{U \times V}{P}$

în care:
U = concentraţia urinară a tiosulfatului;
V = debitul urinar în ml/min.;
P = concentraţia plasmatică a tiosulfatului.

Interpretarea probei. La un adult normal, valorile filtrării glomerulare stabilite prin această metodă variază între 103 şi 130 ml, în medie 117 ml/min.

Clearance-*ul creatininei endogene*

Acesta constă în determinarea colorimetrică a creatininei în sînge şi urină, concomitent cu măsurarea debitului urinar într-un timp bine limitat.

Metoda cu creatinină poate fi folosită după o prealabilă administrare *per os* de creatinină (2—5g). În acest fel se obţine coeficientul de epuraţie a creatininei exogene sau fără încărcare prealabilă cu creatinină, coeficientul de epuraţie a creatininei endogene.

În clinică, coeficientul de epuraţie a creatininei endogene este cel mai utilizat.

Recoltarea probei. Dimineaţa pe nemîncate, bolnavul îşi goleşte vezica prin micţiune sau prin cateterism, iar după o oră îşi adună urina într-un vas curat. După recoltare se dă bolnavului să bea un pahar cu apă. La 30 de minute după golirea vezicii se recoltează 10—15 ml sînge. Recoltarea de sînge şi de urină se repetă în continuare după o oră, astfel că durata probei este de 2 ore; se determină concentraţia de creatinină în probele de urină (U_1 şi U_2) şi în probele de sînge P_1 şi P_2. Se înmulţeşte raportul $\frac{U}{P}$ cu v, adică cu volumul de urină eliminat pe minut.

Coeficientul de epuraţie a creatininei endogene este în condiţii normale 118—168 ml/min.

Avantajul acestei metode constă în faptul că valorile ce se obţin sînt independente de diureză sau de consumul de proteine.

B. **Măsurarea fluxului plasmatic renal.** Se face prin determinarea *clearance*-ului pentru:
— PAH;
— Diodrast;
— P.S.P. (acesta nu este un *clearance* clasic, ci, de fapt, o probă de eliminare provocată. Se va descrie la capitolul respectiv).

Pentru stabilirea fluxului plasmatic renal total (F.P.R.T.), se aplică formula:

$$\text{F.P.R.T.} = \frac{\textit{clearance}\ \text{PAH}}{\text{Extracţia de PAH}}$$

Pentru stabilirea fluxului sanguin renal total (F.S.R.T.) se aplică formula:

$$\text{F.S.R.T.} = \frac{\textit{clearance}\ \text{PAH}}{\text{Extracţia de PAH (1— valoarea hematocritului).}}$$

Clearance PAH (acidul paraaminohipuric)

În timpul probei, bolnavul rămîne nemîncat şi în repaus la pat. La ora 7 i se recoltează o probă de sînge pe fluorură de sodiu şi imediat i se dă să ingere 6 g PAH în 300 ml sirop foarte dulce, deoarece PAH este amar. În cazul administrării intravenoase se introduc 4,7 cg/kilocorp, iar în cazul administrării intramusculare se introduc 3 ml din o soluţie 20%, la care se adaugă 0,05 ml xilocaină şi 0,000 6 mg adrenalină/kilocorp. Trebuie totdeauna realizată o concentraţie mai mică decît 7—10 mg%.

După 30 de minute bolnavul îşi goleşte vezica şi urina se aruncă; apoi mai bea 300 ml apă. La 40 de minute i se recoltează 10 ml sînge, la 50 de minute se evacuează vezica, iar urina se măsoară. La 60 de minute se recoltează a doua probă de sînge. La 70 de minute se evacuează din nou vezica şi se recoltează întreaga cantitate de urină.

În probele de sînge şi urină se determină cantitatea de PAH.

Metoda Smith. Grupul aminic aromatic este diazotat cu nitrit de sodiu, iar culoarea apărută după cuplare cu naftil-etilen-diamină se determină cu ajutorul fotometrului.

Reactivi : 1. Acid tricloracetic 20%.

2. Soluţie nitrit de sodiu 0,1%.

3. Soluţie sulfat de amoniu 0,5% (la frigider se conservă 3 săptămîni).

4. Monoclorhidrat de N-1-naftil-etilen-diamină 0,1%. Se dizolvă 0,1 g în 10 ml alcool metilic la cald şi se completează la 100 ml cu apă. Se păstrează la frigider în sticlă brună. Acest reactiv poate fi înlocuit şi cu difenilamină, dizolvată în alcool absolut.

Dozarea în sînge. Într-o eprubetă de centrifugă se pun 4 ml plasmă şi 4 ml acid tricloracetic. Se agită şi se centrifughează. Din supernatant se iau 5 ml peste care se adaugă 1 ml soluţie de nitrit de sodiu, se agită şi se lasă 2–3 minute; se adaugă 1 ml soluţie de sulfat de amoniu şi 1 ml reactiv monoclorhidrat, se citeşte intensitatea culorii după 15 minute de la adăugarea ultimului reactiv.

Se citeşte la fotometrul cu filtrul S_{53} şi cuva de 1 cm.

Calculul coeficientului de epuraţie a PAH se face după formula $C = UV/P$.

Extincţiile citite sînt raportate la curba de etalonare. Valorile PAH plasmatic aflate vor fi înmulţite cu factorul 0,83.

Factorul 0,83 este egal cu fixarea PAH de proteinele plasmatice, obţinîndu-se, astfel, concentraţia de PAH în mg la ‰ ml plasmă. Dacă soluţia este prea concentrată, depăşind limitele curbei de etalonare, se diluează plasma cu apă distilată, la calcul ţinîndu-se seama de diluţia efectuată.

Dozarea în urină. Urina se diluează 1 :500 sau mai mult în raport cu concentraţia. Cu urina diluată se procedează la fel ca şi la filtratul de plasmă. Urina nu se deproteinizează.

Valori normale. 500–600 ml/min.

Valori patologice sînt considerate valorile sub 400 ml/min.

Clearance-*ul diodrastului*

Constă din determinarea coeficientului de epuraţie a compuşilor iodaţi. În acest scop se administrează derivatul iodorganic diodrast şi se dozează iodul în plasmă şi în urină.

Tehnica. Dimineaţa, pe nemîncate, bolnavul bea 500 ml apă, timp de 30 de minute. Se introduce în vezică o sondă care va fi menţinută tot timpul probei. Se injectează intravenos 1,2 ml diodrast, se notează timpul şi se continuă imediat cu o perfuzie de 300 ml soluţie clorurată izotonică, care conţine 3 ml dintr-o soluţie 1% diodrast. Perfuzia este reglată cu 4 ml/min.; în acest fel se obţine o concentraţie plasmatică constantă de 1–3 mg iod % în tot timpul probei. Urina obţinută în primele 20 de minute de la injecţie se aruncă ; din acest moment se stabilesc coeficienţii de epuraţie a diodrastului, recoltînd sînge pe citrat la 0–50 de minute după injecţia cu diodrast şi urina la 40 şi 60 de minute, după aceeaşi injecţie. Volumul urinii recoltate este măsurat cu precizie.

Dozarea iodului. Se bazează pe titrarea iodului (obţinut din compuşii iodaţi) cu soluţie de tiosulfat de sodiu.

Reactivi : 1. Wolframat de sodiu 10%

2. Acid sulfuric 1/12 N
3. Permanganat de potasiu 7%
4. Acid sulfuric 4 N
5. Azotit acid de sodiu soluţie M
6. Soluţie de uree 10%
7. Iodură de potasiu *pro analisi*
8. Amidon soluţie 1%
9. Tiosulfat de sodiu N/2 000 şi N/200.

Dozarea iodului în sînge. Într-o eprubetă de centrifugă se pun 1 ml plasmă oxalatată, 1 ml soluţie de wolframat de sodiu, 8 ml acid sulfuric N/12. Se agită, se centrifughează şi se decantează. Se ia 1 ml supernatant, se adaugă 0,3 ml permanganat de potasiu 7% + 0,2 ml acid sulfuric 4 N şi 2 ml apă distilată, se fierbe amestecul în baia de apă, timp de 10–20 de minute, şi apoi se adaugă, picătură cu picătură, soluţie de azotit de sodiu pînă la decolorarea completă. Soluţia decolorată se fierbe timp de 3 minute în baie de apă la 100° şi se adaugă 6–8 picături din soluţia de uree. Se agită, se lasă din nou în baia de apă caldă, se elimină toate bulele de bioxid de carbon. Se adaugă apoi 0,5 mg de iodură de potasiu, cîteva picături din soluţia de amidon ca indicator şi se titrează iodul cu o soluţie de hiposulfit de sodiu N/2 000.

Dozarea iodului în urină. Urina se diluează de 100 ori, iar 1 ml urină diluată se tratează la fel ca plasma, după metoda descrisă mai sus. Titrarea se face cu o soluţie de tiosulfat de sodiu N/200.

Calculul coeficientului de epuraţie se face după formula generală $C = UV/P$.

Valori normale = 425–743 ml/min.

C. **Măsurarea reabsorbţiei tubulare.** Se face prin determinarea reabsorbţiei tubulare maxime pentru glucoză. Este aşa-numita probă a T_{mG}.

Tehnica determinării T_{mG}

Capacitatea tubulară M_x de reabsorbţie, pentru glucoză. Calcularea ei se face după formula:

$T_{mG} = Pg \cdot F - UgV$, în care:
T_{mG} = reabsorbţia maximă a glucozei;
P_g = concentraţia plasmatică a glucozei;
F = filtraţia glomerulară (determinată cu ajutorul metodei cu tiosulfat);
Ug = concentraţia urinară a glucozei;
V = debitul urinar pe minut.

Tehnica. Bolnavul rămîne culcat în timpul probei. I se recoltează sînge pe nemîncate. La ora 8, bolnavul bea 500 ml apă pînă la ora 8,30. La ora 9 se recoltează probele-martor de urină şi sînge, se goleşte vezica. La ora 9,05 se injectează intravenos, în timp de 15 minute, un amestec compus din: 100 ml tiosulfat de sodiu 10g% şi 60 ml glucoză 30 g%. Aceasta este aşa-numita doză iniţială. După administratrea ei se perfuzează imediat o soluţie de glucoză 33% cu un debit de 80 de picături pe minut. Această perfuzie serveşte la menţinerea unei concentraţii constante de glucoză în sînge. La 9,20 se goleşte vezica. La 9,30 se recoltează sînge şi urină pentru determinarea concentraţiei de glucoză şi tiosulfat. La 9,40 se recoltează urina, la 9,50 se recoltează sînge, iar la 10 urina. Proba fiind terminată se întrerupe perfuzia.

Dozarea glucozei în urină şi sînge se efectuează prin metodele descrise.

Dozarea tiosulfatului în sînge şi urină se face după procedeul indicat la determinarea coeficientului de epuraţie a acestei substanţe.

Valorile normale cu această metodă sînt 250—483 mg glucoză/min.

D. Măsurarea excreţiei tubulare. Se face prin determinarea excreţiei tubulare maxime pentru PAH. Ea este numită probă a T_m PAH.

Principiu. Crescînd concentraţia de PAH (substanţa ce se elimină în cea mai mare parte prin excreţia tubulară) în plasmă pînă ce atinge limita superioară a capacităţii excretoare tubulare se observă că substanţa respectivă se excretă din acest moment cu o viteză constantă.

Limita superioară în cazul PAH este atinsă la o concentraţie plasmatică de 60 mg%.

Metoda de recoltare. Pe durata probei bolnavul rămîne nemîncat şi în repaus la pat. La ora 7 bolnavul primeşte 500 ml ceai slab, uşor îndulcit. La ora 7,30, se recoltează 10 ml urină şi 10 ml sînge prin venopuncţie pentru dozarea-martor. În continuare, se începe o perfuzie iniţială cu 50 ml soluţie 20% PAH, apoi se continuă cu o perfuzie de întreţinere cu 100 ml soluţie 20% PAH, viteză de picurare de 4 ml/min. La ora 8,30 se goleşte vezica şi se aruncă urina. La ora 8,50 se extrag 10 ml sînge şi se goleşte vezica, se măsoară cantitatea de urină. La ora 9,10 se extrag 10 ml sînge şi se goleşte vezica, se măsoară cantitatea de urină. La ora 9,30 se extrag 10 ml sînge şi se goleşte vezica, se măsoară cantitatea de urină.

Toate probele de sînge se recoltează pe anticoagulant (oxalat de amoniu soluţie 1,34%).

Din probele de sînge şi urină se dozează PAH şi (sau) tiosulfat de sodiu sau creatinina endogenă.

Calcul. Valorile de PAH din plasmă trebuie înmulţite cu factorul 0,83 (reprezentînd legarea PAH-ului cu proteinele plasmatice).

Valorile obţinute se introduc în formula:

$T_{mPAH} = U_{PAH}V - P_{PAH} \cdot F$. (în ml/min). 0,83, în care:
U_{PAH} = concentraţia urinară PAH în mg%;
V = debit urinar în ml/min.;
P_{PAH} = concentraţia plasmatică PAH în mg%;
F = filtratul glomerular (măsurat cu ajutorul *clearance*-ului pentru inulină, tiosulfat de sodiu sau creatinină endogenă).

Valori normale = 60—80 ml/min.

E. Măsurarea fracţiei de filtrare. Este raportul dintre filtratul glomerular şi irigatul plasmatic renal total.

El se calculează după formula:

$$\text{Fracţie de filtrare} = \frac{\textit{clearance}\ \text{(creatinină, tiosulfat)}}{\textit{clearance}\ \text{(PAH, diodrast)}}$$

Valorile normale ale acestui raport sînt de 20%.

O creştere a fracţiunii de filtrare reprezintă o tulburare a irigării renale.

Scăderea sub 20% denotă o limitare a capacităţii de filtrare glomerulară.

F. Probe mixte. *Proba Romeo. Principiu.* Proba permite explorarea separată a glomerulului şi tubului prin determinarea simultană a unui *clearance* de creatinină şi uree.

Mod de prelevare. Cu o seară înainte bolnavul nu mănîncă. Dimineaţa îşi goleşte vezica. Proba se efectuează în clinostatism. După evacuarea vezicii (notînd timpul) se dau bolnavului 500 ml apă sau ceai diluat, în scopul asigurării unei diureze adecvate. După 50 de minute se recoltează 12—14 ml sînge; după 100 de minute bolnavul îşi goleşte vezica şi păstrează toată cantitatea de urină.

Mod de lucru: în probele recoltate se fac următoarele dozări:

- creatinina în sînge;
- creatinina în urină;
- ureea în sînge;
- ureea în urină.

Cu rezultatele obținute se calculează:

I. Uh = debit urinar, exprimat în l/h =

$$= \frac{V_{100} \times 60}{100 \times 1000}$$

V_{100} = toată cantitatea de urină recoltată la 100 de minute de la ingerarea apei.

II. $S.G.A.$ = suprafața glomerulară activă = $= \frac{U \cdot h \times C \cdot u}{Cs}$ exprimată cu l/h.

Valori normale: 5 – 8 l/h.

III. C.D.T.U. = capacitatea tubulară de depurare a ureei $= \frac{U \cdot h \cdot U \cdot u \times 100}{U \cdot s \cdot S \cdot G \cdot A \cdot}$

Valori normale: 25 – 30%

IV. U.D.T. = indice de diureză tubulară = $= \frac{U \cdot h \cdot 100}{S \cdot G \cdot A}$

Valori normale: 1 – 3%.

V.I.R. = indice renal $= \frac{C \cdot u}{U \cdot u \cdot 100}$

Valori normale: 0,03 – 0,12.

Din proba Romeo se poate determina și coeficientul de epurație Van Slyke.

Coeficientul de epurarație van Slyke

Van Slyke a arătat că, dacă urina excretată scade sub 1,5 ml/min., cantitatea de uree scade, fiind proporțională cu rădăcina pătrată a volumului urinar. Coeficientul de epurație Van Slyke arată eficiența cu care rinichiul excretă ureea. Coeficientul poate fi de două feluri. Coeficientul de epurație standard, cînd volumul de urină este în medie de 1 ml/min., și coeficientul de epurație maximă, cînd volumul de urină este peste 2 ml/min.

Recoltarea. Proba se efectuează dimineața pe nemîncate, bolnavul fiind în repaus. La ora 9 bolnavul își golește complet vezica și bea un pahar de apă. După o oră, bolnavul urinează din nou, păstrînd urina și i se recoltează 10–15 ml sînge, apoi bea încă un pahar cu apă, iar după încă o oră urinează din nou păstrînd și această urină.

Se măsoară separat volumul celor două probe de urină, se împarte la 60 pentru a obține debitul urinar pe minut, apoi se dozează ureea în ambele probe, precum și în proba de sînge.

Calcul. Dacă debitul urinar pe minut este mai mare de 1,5 ml, calculul coeficientului de epurație se face după formula: $C_{Mx} = \frac{UV}{P}$, în care:

C_{Mx} = coeficientul de epurație maximă a ureeei exprimat în ml/min.;

U = concentrația ureei în urină;

P = concentrația plasmatică a ureei;

V = debitul urinar pe minut.

Valoarea normală este de aproximativ 75 ml/min. Coficientul de epurație maximă exprimat în procente este egal cu C_{Mx} exprimat în ml/min. × 1,33.

Cînd se exprimă în procente valorile nominale ale coficientului de epurație ureică încep de la 60–65% în sus, iar cele patologice se găsesc sub această limită. Cifrele de 120–200% indică o hiperfuncție renală.

Dacă debitul urinar este sub 1,5 ml/min., calculul se face după formula:

$$C_{ST} = \frac{U\sqrt{V}}{P},$$

în care:

C_{ST} = coeficientul de epurație standard a ureei, U, V și P avînd aceeași semnificație ca în prima formulă.

Valoarea normală este de 54,5 ml.

Pentru a se ușura calculul lui C_{ST} se utilizează tabelul următor al valorilor $\sqrt{V}$:

$\frac{V}{ml/min.}$	$\sqrt{V}$	$\frac{V}{ml/min.}$	$\sqrt{V}$	$\frac{V}{ml/min.}$	$\sqrt{V}$	$\frac{V}{ml/min.}$	$\sqrt{V}$
0,2	0,45	0,7	0,84	1,2	1,10	1,7	1,30
0,3	0,55	0,8	0,89	1,3	1,14	1,8	1,34
0,4	0,63	0,9	0,95	1,4	1,18	1,8	1,38
0,5	0,71	1,0	1,00	1,5	1,23	2,0	1,12
0,6	0,78	1,1	1,05	1,6	1,37	2,1	1,45

Coeficientul de epurație-standard a ureei, exprimat în procente, este egal cu C_{ST} exprimat în ml/min. × 1,85.

Coeficientul de epurație Van Slyke este considerat ca unul din testele cele mai sensibile ale funcției renale, deoarece pune în evidență o deficiență renală înaintea celorlalte metode de explorare.

Interpretarea coeficientului de epurație van Slyke

După autorul tehnicii descrise se pot stabili următoarele norme :

— un coeficient de 5%, care indică un exitus iminent ;

— un coeficient de 10%, care indică o stare extrem de gravă ;

— un coeficient de 20—30%, care indică o insuficiență renală cu pericol de uremie ;

— un coeficient de 30—60%, care indică o insuficiență renală a funcției de excreție.

În urologie : un coeficient sub 30% contraindică operația, un coeficient între 30—60% impune rezerve, iar un coeficient peste 60—70% permite operația, rinichiul putînd face față efortului cerut de intervenție.

TESTELE DE ELIMINARE PROVOCATĂ

În afara *clearance*-ului, funcțiile renale mai pot fi explorate, prin așa-numitele „teste de eliminare provocată'', determinîndu-se viteza cu care o substanță (de obicei un colorant) este excretată prin rinichi.

Testele de eliminare provocată cele mai utilizate sînt : PSP, roșu de Congo, rodanat, roșu fenol, indigo-carmin și altele.

Proba cu fenolsulfonftaleină PSP

Se injectează bolnavului intramuscular 1 ml de fenolsulfonftaleină 0,60% și se determină cantitatea de colorant eliminată prin urină. Determinarea se poate face la colorimetru sau fotocolorimetru cu soluție-etalon sau la comparator.

1. La colorimetru, determinarea se face în felul următor :

Se prepară o soluție-etalon. 1 ml din soluția injectabilă de fenolsulfonftaleină se diluează într-un amestec de 500 ml apă distilată cu 3 ml hidroxid de sodiu 33‰. Se agită și se completează la 1 000 ml cu apă distilată. 1 ml din soluția-etalon conține 6 mg fenolsulfonftaleină. Urina recoltată se compară la colorimetru cu soluția-etalon.

$\frac{h}{h'} \times 100 =$ procentul de colorant eliminat ;

$h =$ înălțimea etalonului care conține 6 mg la litru ;

$h' =$ înălțimea urinei colorate.

Determinarea se poate face și la comparator, preparînd din soluția-etalon următoarele diluții :

Soluția etalon	Apă distilată	Concentrația eliminării	Soluția etalon	Apă distilată	Concentrația eliminării
8	2	80 p. 100	5	5	50 p. 100
7,5	2,5	75	4,5	5,5	45
7	3	70	4	6	40
6,5	3,5	65	3,5	6,5	35
6	4	60	3	7	30
5,5	4,5	55	2,5	7,5	25

Tuburile închise la flacără vor fi păstrate la întuneric, putînd fi utilizate 6 luni.

Determinarea se face în mai multe feluri, după cum este nevoie de evaluarea capacității funcționale a celor doi rinichi, leziunea fiind bilaterală sau în cazul unui proces unilateral, cînd ne interesează să știm care rinichi este lezat.

In procesele bilaterale. Se dau bolnavului să bea 2 pahare de apă. După 20 de minute, bolnavul urinează, această urină fiind păstrată. I se face o injecție intramusculară cu 1 ml din soluția de fenolsulfonftaleină. După o oră și 10 minute, bolnavul trebuie să-și golească vezica. La nevoie urina se recoltează cu sonda. După încă o oră, adică la 2 ore și 10 minute, bolnavul trebuie să-și golească din nou vezica. Fiecare probă de urină este pusă într-un balon cotat de 1 litru, i se adaugă 3 ml hidroxid de sodiu $33^0/_{00}$ și se completează la 1000 ml cu apă distilată. Se fac determinările, fie colorimetric, fie la comparator, punîndu-se ca martor în fața eprubetei cu fenolsulfonftaleină eprubeta cu urină obținută înainte de injectare. Dacă rinichii funcționează normal, în prima probă de urină la o oră și 10 minute vom găsi 40—50% colorant, iar în a doua 75% din cantitatea injectată.

In procesele unilaterale. Bolnavul bea două pahare de apă cu 30 de minute înainte de probă. Se face cateterism ureteral bilateral. Se injectează intravenos colorantul și după 5 minute, se recoltează urina separat din fiecare sondă, în eprubete care conțin cîteva picături din soluția de hidroxid de sodiu $33^0/_{00}$. Probele următoare de urină se recoltează la fiecare 15—30 de minute, timp de o oră. Se urmărește momentul apariției și apoi al dispariției colorantului. Urina din eprubetă capătă o culoare purpurie, care pălește treptat și se determină procentul colorantului eliminat în fiecare probă în parte, după tehnica descrisă mai sus.

Dacă rinichii funcţionează normal, colorantul apare în urină la 5 minute după injecţie, dar poate întîrzia în unul sau ambii rinichi, datorită unui reflex provocat de introducerea sondei.

În primele 5 minute urina ambilor rinichi trebuie să conţină 35—45%; în primele 30 de minute, 50—60%; şi după o oră 65—80% din cantitatea de colorant injectată.

După terminarea probei se scot sondele şi se controlează dacă urina nu a trecut pe lîngă sonde în vezica urinară, ceea ce poate falsifica rezultatul.

În insuficienţa renală, PSP scade între 25 şi 50%, iar în uremie chiar sub 25%.

Eliminarea PSP este influenţată de o serie de factori extrarenali; scade în insuficienţa cardiacă pînă la 45%.

Eliminarea este, de asemenea, diminuată în leziunile hepatice, stări febrile, utilizări de anestezice.

Proba PSP dă rezultate preţioase, mai ales în explorarea rinichiului la hipertensivi. La bolnavii care nu prezintă insuficienţă cardiacă excreţia PSP în decurs de 2 ore nu depăşeşte 50%, în timp ce în boala hipertensivă complicată cu insuficienţă cardiacă această excreţie nu trece de 45%.

Proba cu indigo-carmin

Tehnica. După o prealabilă cistoscopie se injectează bolnavului, intravenos, lăsînd cistoscopul pe loc, 20 ml dintr-o soluţie sterilă de indigo-carmin 0,4%.

Se determină, pentru fiecare rinichi, intervalul dintre injecţie şi apariţia urinii albastre.

Interpretare. În mod normal, excreţia albastră apare după 5—10 minute, iar după 15—20 de minute atinge o intensitate considerabilă, urina avînd o culoare albastră-închis. În bolile renale, eliminarea poate fi întîrziată, intermitentă sau să lipsească.

O excreţie normală de colorant nu constituie însă o dovadă că rinichiul este sănătos.

Proba cu indigo-carmin, fiind una din probele cele mai scurte, este utilizată în urologie pentru diagnosticul afecţiunilor renale, controlîndu-se eliminarea separată a celor doi rinichi (cromocistoscopia). În acelaşi scop se mai poate cerceta la cele două urini recoltate separat: culoarea, greutatea specifică, punctul crioscopic, proteinele, ureea, zaharurile, clorurile şi sedimentul.

Proba cu rodanat de sodiu

Rodanatul de sodiu, injectat intravenos în cantităţi cunoscute, difuzează uniform în spaţiul extracelular, astfel că după 60 de minute de la injectare se poate doza în ser cantitatea nedifuzată.

Reactivi: 1. Soluţie sterilă de rodanat de sodiu N. Se dizolvă 11,7 g rodanat în 100 ml apă distilată la balon cotat. Se verifică concentraţia prin titrare cu soluţie de azotat de argint.

2. Acid tricloracetic 20%.

3. Reactiv feric, format din 33,45 g clorură ferică, 25 ml acid azotic concentrat şi apă distilată pînă la 1 000 ml.

Tehnica. Se cîntăreşte bolnavul dimineaţa pe nemîncate şi se recoltează 10 ml sînge. Se injectează apoi intravenos 10 ml soluţie normală de rodanat de sodiu. După 60 de minute se recoltează încă 10 ml sînge. Se separă serul, se iau cîte 2 ml ser din fiecare probă în eprubete de centrifugă şi se adaugă 2 ml acid tricloracetic 20%. Se agită bine, se lasă în repaus 5—10 minute, apoi se centrifughează. La 2 ml din supernatantul limpede se adaugă 2 ml reactiv feric şi se citeşte extincţia probei la fotometrul Pulfrich cu cuva de 5 mm şi filtru S_{47}. Se raportează extincţia la curba-etalon şi se calculează concentraţia de rodanat în ml/100 ml.

Curba-etalon se pregăteşte cu o scară de soluţie-etalon care conţine între 1 şi 20 mg% rodanat de sodiu. La 2 ml din fiecare diluţie se adaugă 2 ml acid tricloracetic şi 4 ml reactiv feric. Se citeşte la fotometru faţă de proba constituită de 2 ml apă + 2 ml acid tricloracetic + 4 ml reactiv feric.

Calcul:

$$\text{Volumul extracelular} = \frac{\text{Cantitatea de rodanat în mg injectată}}{\text{Concentraţia serică de rodanat în mg/100ml}}$$

Valorile normale variază între 24 şi 29% din greutatea corporală.

Proba cu roşu de Congo

Dacă se injectează roşu de Congo intravenos, colorantul este fixat de ţesutul amiloid şi apare o scădere remarcabilă a concentraţiei lui în ser.

Tehnica. Pe nemîncate, bolnavul îşi goleşte vezica, apoi i se recoltează 10 ml sînge şi în continuare i se injectează 2 ml/kilocorp dintr-o soluţie sterilă de roşu de Congo 0,6 g%. După

3 minute şi după o oră de la injectare se recoltează cîte 10 ml sînge şi, totodată, probe de urină. După centrifugare se separă serurile, iar urinile sînt filtrate. Se măsoară apoi extincţiile serurilor la fotometru cu filtru S_{50} şi cuva de 0,5 mm. Cuva-martor conţine serul-martor recoltat înainte de probă.

Calcul. Scăderea procentuală a colorantului în ser $= \frac{100 \times E_2}{E_1}$

în care:

E_1 = extincţia serului obţinut după 3 minute;
E_2 = extincţia serului obţinut după o oră.

Exemplu: $E_1 = 0{,}32$
$E_2 = 0{,}03$

Procentajul colorantului prezent după 1 oră este $\frac{0{,}03}{0{,}32} \times 100 = 9{,}4\%$

Pierderea de colorant în decurs de 1 oră este $100 - 9{,}4 = 90{,}6\%$.

Probele de urină emise înainte şi la o oră după injectare sînt filtrate şi se determină, macroscopic, prezenţa colorantului în urină.

Interpretare. În mod normal, scăderea colorantului este 15–35%. Valorile între 35 şi 65% se întîlnesc, atît în nefroza lipoidică, cît şi în cea amiloidă. Valorile peste 65% traduc o amiloidoză. În mod normal, a doua probă de urină este net colorată. În amiloidoză, a doua probă de urină nu este de loc sau numai foarte puţin colorată. Colorantul roşu de Congo dispare repede din sînge şi, în cazul bolii colagenului, fiind fixat de ţesutul reticuloendotelial.

Proba cu bicarbonat de sodiu

Proba durează 2 ore. Se goleşte vezica complet, recoltînd urina, apoi se dă bolnavului dimineaţa pe nemîncate să bea 400 ml apă, în care s-a dizolvat 20 g bicarbonat de sodiu. În curs de 2 ore, bolnavul va urina la fiecare 30 de minute. Se determină pH celor 5 urini colectate. Determinarea se face colorimetric. La oamenii sănătoşi în timpul celor două ore, pH va atinge valori de cel puţin 8. Cu cît funcţia renală este mai alterată, cu atît alcalinitatea va creşte mai puţin.

Proba poate fi simplificată dîndu-se bolnavului, la fiecare 2 ore, 5 g de bicarbonat de sodiu şi urmărindu-se cît bicarbonat de sodiu este necesar pentru a alcaliniza urina. La oamenii sănătoşi, urina devine alcalină după prima sau a doua administrare. La bolnavii de rinichi este necesară o cantitate mare de bicarbonat de sodiu care poate merge pînă la 50–80 g. În nefroze, eliminarea bicarbonatului se face normal, iar în glomerulonefrita cu nefroză, eliminarea poate fi tulburată. Metoda de bicarbonat de sodiu are dezavantajul că nu este concludentă în cazurile de insuficienţă renală incipientă, ci numai în cazul de insuficienţă renală gravă, atunci cînd parechimul renal este în mare măsură compromis. În afară de aceasta, proba este tulburată de o serie de factori extrarenali, ca vărsăturile abundente etc.

La această probă se ţine seamă de stările de acidoză, în care caz cantitatea de bicarbonat de sodiu necesară alcalinizării este foarte mare.

EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A FUNCŢIEI DE MENŢINERE A ECHILIBRULUI OSMOTIC

Funcţia de ansamblu a rinichiului se exprimă prin menţinerea homeostaziilor organismului. Această menţinere se realizează prin intervenţia unor mecanisme funcţionale, care asigură eliminarea variabilă, în funcţie de nevoi, a apei, electroliţilor şi a unor substanţe organice.

În explorările biologice, concentraţiile ionice pot fi exprimate sub trei forme:

A. **Concentraţia în mg%**: se stabileşte concentraţia ionului respectiv şi se exprimă în mg la 100 ml soluţie.

B. **Concentraţia în mEq**: se numeşte mEq (miliechivalent) al unui ion numărul care exprimă raportul dintre greutatea ionului respectiv exprimată în mg şi valenţa sa. Astfel:

$$1 \text{ mEq } Na^+ = \frac{23}{1} \text{ mg} = 23 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq } K^+ = \frac{39}{1} = 39 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq } Ca^{++} = \frac{40}{2} \text{ mg} = 20 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq } Mg^{++} = \frac{24{,}2}{2} = 12{,}1 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq } Cl^- = \frac{35{,}5}{1} = 35{,}5 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq } HPO_4^- = \frac{96}{2} = 48 \text{ mg}$$

Concentraţia în mEq a unui ion dintr-o soluţie se calculează împărţind concentraţia exprimată în mg la greutatea atomică a ionului respectiv şi înmulţind cu valenţa sa.

$$\text{mEq} = \frac{\text{Concentraţia în mg} \times \text{valenţa}}{\text{Greutatea atomică}}$$

C. **Concentraţia în mosM**: se numeşte mosM (miliosmol) masa particulei (fie ion, fie moleculă), exprimată în mg.

Astfel :

1 mosM Na^+ = 23 mg
1 mosM K^+ = 39 mg
1 mosM Ca^{++} = 40 mg
1 mosM glucoză =180 mg
1 mosM uree = 60 mg

Concentraţia în mosM a unui ion dintr-o soluţie se calculează împărţind concentraţia exprimată în mg la greutatea atomică :

$$\text{mosM} = \frac{\text{Concentraţia în mg}}{\text{Grutatea atomică}}$$

EXPLORAREA FUNCŢIEI DE MENŢINERE A ECHILIBRULUI OSMOTIC

Se poate face prin :

1. măsurarea rezistivităţii (vezi Capitolul ,,Metode fizico-chimice de analiză'').
2. Determinarea punctului crioscopic.

Determinarea punctului crioscopic

Presiunea osmotică exercitată de o substanţă dizolvată produce scăderea presiunii vaporilor solventului. Din această cauză, temperatura la care faza solidă a solventului este în echilibru cu faza lichidă coboară şi, în consecinţă, punctul de congelare a soluţiei este mai coborît decît punctul de congelare al solventului pur.

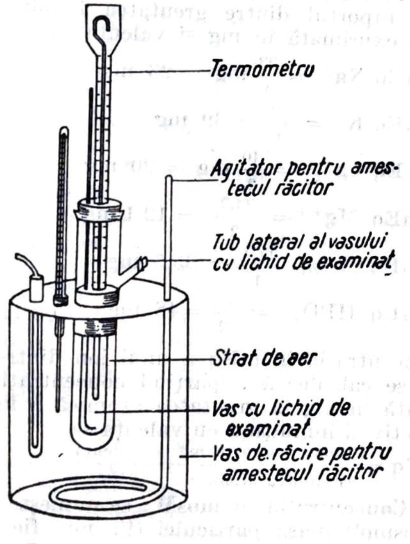

Termometru
Agitator pentru amestecul răcitor
Tub lateral al vasului cu lichid de examinat
Strat de aer
Vas cu lichid de examinat
Vas de răcire pentru amestecul răcitor

Fig. 114. — Crioscopul de tip Beckmann.

Dacă se notează cu θ_1 temperatura de congelare a soluţiei studiate şi cu θ_0 temperatura de congelare a solventului, atunci coborîrea punctului de congelare, notată $\Delta\theta$, va fi dată de expresia :

$\Delta\theta = \theta_1 - \theta_0$ $\Delta\theta$ este totdeauna negativ.

Pentru soluţiile diluate, coborîrea punctului de congelare este proporţională cu concentraţia moleculară a substanţei dizolvate (cantitatea de molecule-gram de substanţă, dizolvate în 1 000 g solvent).

Pentru electroliţi, scăderea punctului de congelare este mai mare decît valoarea calculată pe baza greutăţii moleculare, datorită faptului că prin disociere electrolitică se produce o mărire a numărului de particule din soluţie.

Tehnica determinării punctului crioscopic. Determinarea se face cu ajutorul crioscopului tip Beckmann.

Vasul de răcire se umple cu un amestec format din trei părţi gheaţă, mărunt sfărîmată, plus o parte clorură de sodiu şi apă; clorura de sodiu şi apa se adaugă pînă cînd amestecul capătă o temperatură de —3° pînă la —4°. Ea nu trebuie să scadă sub —6°. Temperatura amestecului răcitor se menţine constantă cu ajutorul unui agitator. Se introduce în vasul cu amestecul răcitor, vasul mic cu lichidul de examinat: ser, sînge defibrinat, plasmă heparinată; în acest din urmă caz se utilizează 0,1 ml heparină 5% pentru 10 ml sînge. Vasul mic este prevăzut cu un termometru special gradat în sutimi de grad C şi un agitator. Lichidul de examinat (4—5 ml) trebuie să acopere în întregime masa de mercur a termometrului. Se pune în mişcare agitatorul cu o viteză uniformă de 1—2 ture pe secundă. Se va evita frecarea agitatorului de peretele vasului sau de termometru. În momentul trecerii lichidului de examinat în stare solidă se produce o eliberare de căldură (căldura latentă de congelare), iar coloana de mercur a termometrului, care în primele momente coborîse, se va ridica brusc pînă la un anumit punct, la care rămîne stabilă un anumit timp. Acesta este punctul fizic de congelare a lichidului respectiv. Se recomandă ca înainte de fiecare determinare, să se stabilească punctul 0 al termometrului faţă de apa distilată, iar după citirea rezultatului, la proba de examinat să se facă corecţia respectivă. De asemenea, se recomandă ca valorile crioscopice să fie determinate de două ori.

De exemplu : imediat după determinarea timpului de congelare a apei se determină cel al

Valori normale 0,5 — 1,6 µM ml/ser pentru TGP şi 0,6 — 2,3 µM pentru TGO. Raportul normal TGO/TGP este de 1,3 — 1,4.

Un micromol este egal cu 15 unităţi Karmen.

Investigarea transaminazei serice în afecţiunile hepatice este deosebit de semnificativă. Astfel, hepatita infecţioasă este asociată cu o mărire a TGO şi TGP, care atinge un maxim, după care urmează o descreştere gradată pînă la atingerea valorilor normale o dată cu faza de revenire a bolii. Recăderile la hepatite se însoţesc, în marea lor majoritate, de creşteri secundare în activitatea TGO şi TGP.

Se pare că schimbările în activitatea transaminazei reflectă starea clinică a bolnavului cu mai mare precizie decît testele hepatice clasice. Astfel, TGO şi TGP sînt crescute în faza prodromală şi clinică a hepatitelor acute, cînd probele hepatice sînt nealterate. Pe de altă parte este de semnalat că reacţiile enzimatice nu sînt necesar corelate cu testele de explorare funcţională, astfel încît modificările transaminazei serice nu reprezintă un index al funcţiei celulei hepatice.

Wroblewski, studiind o epidemie de hepatite infecţioase acute, a găsit 5 categorii de bolnavi :

1. Boli asimptomatice, cu TGO, bilirubină şi timol normale.

2. Boli asimptomatice, cu TGO crescut, bilirubină şi timol normale.

3. Boli asimptomatice, cu TGO foarte crescut, bilirubină normală şi timol anormal.

4. Boli simptomatice cu TGO, bilirubină şi timol anormale.

5. Boli simptomatice, cu hepatită icterică şi teste modificate. Aceste date prezintă o mare importanţă epidemiologică, întrucît indică posibilitatea decelării cazurilor importante, care pot fi o sursă de contaminare. Numeroşi autori citează creşteri ale TGO în ciroze Laennec, uneori asociate cu valori nesemnificative de TGP.

Din punct de vedere al activităţii transaminazei în ciroze, aceasta se poate sistematiza în 4 posibilităţi fiziopatologice :

1. Ciroză neevolutivă şi compensată, cu teste hepatice anormale şi TGO în limitele valorilor normale.

2. Ciroză neevolutivă, dar decompensată, cu manifestări clinice (icter), teste hepatice modificate faţă de normal şi TGO în limite normale.

3. Ciroză evolutivă, dar compensată, cu alterare celulară, fără decompensare, teste hepatice modificate faţă de normal şi TGO crescută.

4. Ciroză evolutivă şi decompensată, cu retenţie de lichid, hiperbilirubinemie, teste hepatice profund alterate şi TGO mult crescută.

Diagnosticul diferenţial dintre ciroza biliară primară şi secundară, pe baza activităţii TGO, este nesemnificativ.

Creşterea transaminazei serice în cancerele hepatice, este un test tot aşa de sensibil ca şi fosfataza serică, nefiind spre deosebire de aceasta, influenţat prin metastazele osoase.

Tumorile benigne nu sînt însoţite de creşteri apreciabile, valori ridicate găsindu-se, în majoritatea cazurilor, la bolnavii cu malignizări.

Ornitincarbamiltransferaza.

Este enzima care catalizează următoarea reacţie :

1. Ornitină + carbamilfosfat → citrulină + fosfat. S-a arătat că aceeaşi enzimă catalizează, de asemenea, reacţiile :

2. Citrulină + arseniat → ornitină + carbamil arseniat.

3. Carbamil arseniat → CO_2 + NH_3 + arseniat.

4. Citrulină + arseniat → orintină + CO_2 + + NN_3 + arseniat.

Reacţia 3 reprezintă o descompunere neenzimatică a carbamilarseaniatului instabil.

Reacţia 4 reprezintă suma reacţiilor 2 şi 3 şi formează baza determinării activităţii OCT prin măsurarea vitezei de formare a NH_3, cînd citrulina este incubată în prezenţa arseniatului.

Reactivi : 1. Tampon citrulină — arseniat pH = 7,1.

Se păstrează la frigider.

2. Tampon arseniat pH = 7,1. Se păstrează la frigider.

3. Tampon borat pH = 13.

4. Soluţie standard de sulfat de amoniu.

5. Reactiv Nessler (vezi formarea la determinarea N total).

6. Acid percloric 4 N.

Tehnica. Reacţia se efectuează în tuburi de centrifugă :

Proba	*Martorul*
1 ml ser	1 ml ser
1 ml tampon citrulină arseniat	1 ml tampon arseniat
Se lasă 24 de ore la 37°, apoi se adaugă:	Se lasă 24 de ore la 37°, apoi se adaugă:
0,2 ml acid percloric 4 N şi se centrifughează	0,2 ml acid percloric 4 N şi se centrifughează

Din supernatante se dozează amoniacul cu ajutorul unei camere de microdifuziune Conway, în modul următor:

În camera exterioară a dispozitivului se pipetează 1 ml supernatant, camera centrală conţinînd 1,5 ml HCl 0,1 N.

Se adaugă în camera exterioară 3 ml tampon borat şi se închide. Se permite celor două fluide să se amestece, lăsîndu-le la incubat la 37° 2 ore şi 30 de minute.

Se dozează apoi NH_3 adunat în camera din centru, în modul următor:

1 ml din soluţia clorhidrică din centrul camerei Conway se introduce în cuva fotometrului. Se adaugă: 3,5 ml apă distilată, 0,5 ml reactiv Nessler.

Se citeşte după 10 minute la $\lambda = 410$ mμ faţă de apă distilată.

Folosind curba de etalonare se determină numărul de micromoli de amoniac pe 0,5 ml ser formaţi în ambele tuburi. Se scade valoarea martorului din cea a probei.

Curba de etalonare se trasează folosind o soluţie de concentraţie cunoscută de sulfat de amoniu.

Valori normale: 0 — 0,25 μM NH_3/0,5 ml ser.

Proba este semnificativă, în următoarele afecţiuni, cînd găsim valori crescute după cum urmează:

Ciroza hepatică, de la 0,5 la 1,2 μM NH_3/0,5 ml ser.

Colecistită acută, de la 1 la 8 μM NH_3/0,5 ml ser.

Cancer cu metastaze hepatice, de la 0,5 la 10 μM NH_3/0,5 ml ser.

Hepatită infecţioasă de la 0,5 la 25 μM NH_3/0,5 ml ser.

Polipeptidaza

În grupul polipeptidazelor intră enzimele proteolitice care scindează legătura peptidică, eliberînd polipeptide inferioare pînă la acizi aminaţi.

Determinarea activităţii polipeptidazei serice se bazează pe descompunerea enzimatică a unui substrat tip — peptona Witte — şi determinarea resturilor carboxilice libere, cu KOH (în metoda titrimetrică) sau a triptofanului liber cu apă de brom (în metoda colorimetrică).

Metoda titrimetrică Schierge

Reactivi: 1. Soluţie de peptonă Witte 5%.
2. Soluţie cloruro-sodică $9^{0}/_{00}$.
3. Alcool 96°.
4. Hidroxid de potasiu N/100.
5. Soluţie alcoolică de fenolftaleină 1%.
6. Toluen.

Tehnica. În două eprubete numerotate nr.1 şi nr. 2 se pun cîte 1 ml ser + 1 ml soluţie peptonă. Eprubeta nr.1 se agită uşor, apoi se adaugă cîteva picături de toluen. Se închide bine cu dop şi se lasă 2 zile la termostat la 37°. Eprubeta nr.2 sau proba martor este tratată imediat cu 18 ml alcool, iar după o jumătate de oră se separă precipitatul prin filtrare sau centrifugare. La 1 ml supernatant se adaugă 2 picături de soluţie de fenolftaleină şi se titrează cu hidroxid de potasiu pînă la apariţia şi persistenţa unei coloraţii roşii slabe. Se notează cu N numărul de ml de hidroxid de potasiu consumaţi la titrarea probei martor. Proba de cercetat se scoate din termostat, se răceşte şi se tratează cu 18 ml alcool. Se filtrează. La 12 ml supernatant se adaugă 2 picături de fenolftaleină şi se titrează cu hidroxid de potasiu pînă la apariţia unei coloraţii roşii slabe. Se notează cu N_1 numărul de ml de hidroxid de potasiu consumaţi la titrarea probei de cercetat.

Calcul. Diferenţa dintre cantităţile de hidroxid de potasiu consumate la proba de cercetat şi la proba martor reprezintă activitatea polipeptidazică a 1 ml ser.

Valori normale = 1-2,5 ml KOH N/100.

Metoda colorimetrică Schierge. Metoda este introdusă printre mijloacele de explorare funcţională a ficatului, deoarece valori crescute au fost întîlnite aproape cu regularitate în afecţiunile hepatice. Într-un studiu făcut pe 5 000 de cazuri, autorul metodei arată că reacţia este îndeosebi utilă pentru urmărirea evoluţiei hepatitelor. În hepatite, activitatea polipeptidazică este pozitivă înaintea testelor de disproteinemie şi nu variază paralel cu acestea sau cu pigmenţii biliari şi pe de altă parte, se negativează la vindecare. Normalizarea ei în cursul hepatitei implică un prognostic bun. Reacția este 100% pozitivă în leziunile hepatice difuze, poate fi însă negativă în unele ciroze în care distrugerile mari de parenchim nu mai permit formarea unei cantități suficiente de enzimă.

Reactivi : 1. Soluție de peptonă Witte 5%.

2. Acid acetic N/100 conținînd 1% clorură de sodiu.

3. Apă de brom saturată. Bromul se află în exces pe fundul sticlei.

Tehnica. Într-o eprubetă se amestecă 1 ml ser sanguin cu 1 ml dintr-o soluție de peptonă Witte 5%. Se adaugă cîteva picături de toluen, se închide cu un dop și se lasă 24 de ore la 37°. Apoi se adaugă 6 ml soluție acid acetic N/100 care conține 1 % clorură de sodiu și se amestecă bine. Eprubeta se fierbe în baie de apă 3 minute și se centrifughează. Supernatantul clar este trecut într-o altă eprubetă și tratat cu apă bromată picătură cu picătură circa 0,5 ml. Paralel se prepară o probă martor cu serul inactivat. În mod normal, în aceste condiții experimentale reacția dă un rezultat negativ sau cel mult slab pozitiv, neivindu-se nici o colorație sau o colorație roz extrem de slabă.

Colorație roz = reacție slab pozitivă (+).

Colorație roșie = reacție pozitivă (++).

Colorație violetă = reacție intens pozitivă (+++).

Leucinaminopeptidaza

Este enzima care catalizează următoarea reacție :

L- leucil-β-naphtylamida + $H_2O \xrightarrow{LAP}$ leucina + β-naphtylamină.

β-naphthylamina formată este în primul rînd diazotată și apoi combinată cu un colorant bazic.

N-(l-naphthyl) — ethylendiamina.

În urma acestei reacții se formează o colorație purpurie, proporțională cu cantitatea de β-naphthylamină, deci proporțională și cu activitatea leucinaminopeptidazei.

Reactivi : 1. Clorhidrat de L-leucil-β-naphthylamidă. O soluție 0,00137 M (0,4 mg/ml) se amestecă cu un volum egal de tampon fosfat 0,2 M pH = 7, astfel încît soluția finală să fie de pH = 7,1. Se conservă la rece.

2. Nitrit de sodiu 0,1%. Se prepară extemporaneu.

3. Sulfamat de amoniu 0,5%. Se păstrează la rece.

4. N- (1-naphthyl) ethylendiamină. Soluție alcoolică 0,05%. Se păstrează la rece. În momentul alterării se colorează.

5. Acid tricloracetic 25%.

6. Acid tricloracetic 13,3%.

7. Soluție standard de β-naphthylamină pentru efectuarea curbei 15,012 μg/ml.

Tehnica. Se diluează serul 1/50 cu apă distilată. Se prepară 3 tuburi de centrifugă după cum urmează :

1 (*Blancul reactivilor*)	2 (*Blancul serului*)	*3*
1 ml H_2O	1 ml H_2O	1 ml reactiv 1
1 ml reactiv 1	1 ml ser diluat	1 ml ser diluat

Se incubează toate tuburile 1 oră la 37°.

Se oprește reacția prin adăugarea a 1 ml acid tricloracetic 25% în fiecare tub. Se agită. Se centrifughează.

Se ia 1 ml supernatant și se adaugă 1 ml nitrit de sodiu.

Se amestecă. Se lasă să stea exact 3 minute la temperatura camerei.

Se adaugă 1 ml sulfamat de amoniu. Se amestecă. Se lasă să stea exact 2 minute la temperatura camerei.

Se adaugă apoi în fiecare tub reactiv nr.4. Se amestecă. Se lasă 20-60 de minute la temperatura camerei.

Se determină densitatea optică a probelor față de apă la λ = 580 mμ.

Cu ajutorul curbei de etalonare se determină numărul de unități de LAP pentru fiecare tub. Suma unităților tuburilor 1 și 2 se scade din numărul de unități găsite în tubul nr.3.

Valoarea rezultată reprezintă numărul de unități de activitate a LAP a unui ml de ser diluat de 50 de ori.

1 u. = 0,0417 μg β- naphthylamină eliberată în 1 oră la 37°.

Valori normale : 70 — 200 u./1 ml ser diluat 1/50.

***Curba de etalonare*:**

Tub. nr.	β-naftilamină (ml)	Acid tricloracetic 13,3% (ml)	Unităţi LAP/ml ser 1/50	Densitatea optică 580 mμ
1	0	1	0	
2	0,1	0,9	108	
3	0,2	0,8	216	
4	0,4	0,6	432	
5	0,6	0,4	648	
6	0,8	0,2	864	

În continuare se lucrează exact ca pentru probele de ser, adăugîndu-se pe rînd celor 6 tuburi cîte 1 ml azotit de sodiu, sulfonat de amoniu şi reactiv nr.4, cu respectarea strictă a perioadelor de repaus.

Se trasează o curbă, înscriind pe ordonată densităţile optice citite, iar pe abscisă, numărul de unităţi de LAP pe ml ser 1/50. Dăm în fig. 121 o curbă de calibrare tipică, executată la spectrofotometrul Beckman.

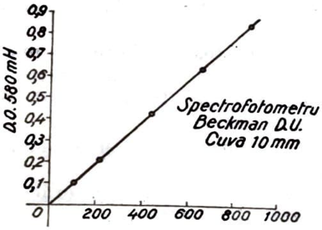


Fig. 121. — Curba de calibrare a leucinaminopeptidazei.

Cele mai ridicate valori ale activităţii leucinaminopeptidazice în ser au fost găsite în cancerul capului de pancreas: 450-1 270 u. În pancreatita acută se observă o creştere temporară a activităţii LAP în ser (210-360μ), care revine la normal în 2-7 zile.

Activitatea LAP în ser este crescută fiziologic în al treilea trimestru al sarcinii.

Amilaza

Amilaza este enzima care hidrolizează macromolecula polizaharidelor pînă la maltoză, trecînd prin stadii intermediare de dextrine.

Punerea în evidenţă a activităţii enzimatice se poate face principial în 2 moduri:

A. Se determină cantitatea de zahăr reductor care se formează din substrat sub acţiunea enzimei în unitatea de timp. Acesta este principiul metodelor zaharimetrice.

B. Se determină schimbarea culorii produsă prin reacţia amidonului cu iodul. Acest al doilea mod de lucru este întrebuinţat în tehnicile curente ale laboratorului clinic.

Pe acest principiu se bazează două categorii de metode:

1. Metodele iodometrice, care măsoară *concentraţia* la care enzima nu mai poate hidroliza amidonul pînă la stadiul de dizaharid, necolorabil cu iodul, într-un interval de timp dat.

Tipul clasic al tehnicii iodometrice îl reprezintă metoda Wohlgemuth.

2. Metodele amiloclastice, care măsoară *timpul* necesar unui sistem enzimă-substrat tip, pentru a hidroliza produsul la stadiul de dizaharid, necolorabil cu iodul.

Tipul clasic al tehnicii amiloclastice îl reprezintă metoda Somogyi.

Determinarea amilazei se bazează pe acţiunea specifică a amilazei de a hidroliza amidonul pînă în stadiul de dextrină.

Metoda Wohlgemuth

Reactivi:

1. Soluţie de clorură de sodiu $1^0/_0$.
2. Soluţie de amidon $1/^0_{00}$ în soluţie de clorură de sodiu $9^0/_{00}$.
3. Soluţie de iod N/50.

Tehnica. 12 eprubete de hemoliză, numerotate de la 1 la 12, sînt aşezate într-un stativ. Se pun în prima eprubetă 2 ml ser, iar în celelalte 11 eprubete, cîte 1 ml soluţie de clorură de sodiu 1%. Din prima eprubetă se ia 1 ml lichid, se trece în eprubetă, se ia 1 ml lichid, se trece în eprubeta a doua, se amestecă, şi din eprubeta a doua se trece 1 ml în următoarea. Operaţia se repetă în acelaşi mod pînă la ultima eprubetă. Din ultima eprubetă se aruncă 1 ml de amestec. În acest mod se obţine seria de diluţii de la 1/1 la 1/2 048. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă 2 ml din soluţia de amidon $1^0/_{00}$, se agită şi se pun la 37° timp de 30 de minute. Eprubetele scoase de la 37° sînt răcite repede la un curent de apă şi se adaugă în fiecare cîte 1-3 picături de soluţie iod N/50. Eprubetele care conţin amidon nehidrolizat prezintă o culoare albastră. Eprubetele care conţin amidon hidrolizat se vor colora în roșu-albastru, albastru-violet, roșu-gălbui sau galben.

Limita inferioară acțiunii enzimatice este indicată de prima eprubetă din serie care prezintă culoarea roșu-albastru.

O unitate de amilază sau unitate Wohlgemuth (UW) este cantitatea de ferment care poate hidroliza 1 mg amidon în 30 de minute la 37°, pînă în stadiul de dextrină.

Calcul. Dacă culoarea roșu-albastru se vede în eprubeta nr.6, calculul se face pe baza eprubetei nr.5; diluția în eprubeta nr.5 este 1/16. Rezultatul se obține în unități Wohlgemuth, înmulțind titrul diluției cu 2.

Activitatea amilazică pentru 1 ml din lichidul de cercetat în exemplul dat este 32 U.W.

Valorile normale pentru serul sanguin = = 16—32 U.W.

Pentru determinarea amilazei în urină se aplică tehnica de la ser. Deoarece valorile diferă mult în porțiunile separate, determinarea se face în urina colectată în 24 de ore conservată cu toluol.

Valorile normale sînt de 16—64 U.W.

Determinarea amilazei în sucul pancreatic se face tot prin metoda Wohlgemuth, dar cu unele mici modificări. Activitatea amilazei fiind foarte mare, sucul pancreatic este diluat 1/10, iar soluția de amidon este 1%.

În seria de eprubete se adaugă 5 ml soluție amidon 1% în loc de 2 ml soluție amidon 1‰.

Citirea rezultatului se face după adăugarea a 1-2 picături de soluție de iod 1/10.

Valorile normale în sucul pancreatic sînt de 256-2 048 U.W. După refluxare cu eter se pot citi valori cuprinse între 6 000 și 8 000 U.W. Valorile crescute indică o afecțiune a pancreasului sau o afecțiune a veziculei biliare. Valori foarte ridicate se găsesc în necroza pancreatică. Valori crescute ale amilazei se mai pot găsi în ulcere perforate, diskinezii biliare, uremie.

Metoda amiloclastică Somogyi

Reactivi : 1. Soluție de amidon sterilă pH = = 6,8

2. Soluție de iod 0,002 N în iodură de potasiu 2%.

Tehnica. În 5—6 tuburi se introduc cîte 0,25 ml soluție iod (2). Într-o altă eprubetă se pipetează : 2 ml amidon și se lasă 5 minute la 37°. Se adaugă 0,5 ml ser, notîndu-se timpul. După 3 minute scoatem din acest amestec 0,25 ml, pe care-i introducem în soluția de iod. Repetăm această operație de fiecare dată într-un nou tub cu soluție de iod, pînă ce obținem o culoare brun-roșcată. Se determină timpul necesar pentru a atinge sfîrșitul reacției.

Prepararea reactivului 1

100 g amidon se suspendă în 1 l HCl 0,01 N. Se agită din cînd în cînd, timp de o oră. Se lasă să se sedimenteze. Acidul este îndepărtat, iar peste sedimentul de amidon se adaugă 1 l NaCl 0,05%. Se agită, se lasă să se sedimenteze. Se decantează. Se mai repetă o dată spălarea cu NaCl 0,05%. Se separă apoi amidonul, care este lăsat să se usuce la aer. Se iau din acesta 15 g, se mojarează bine cu 50 ml apă distilată. Se transvazează cantitativ în 900 ml apă care fierbe. Se agită puternic.

Se fierbe 0,5—1 minut cu agitare. Se ține apoi 15-30 de minute într-o baie de apă, gura balonului fiind acoperită cu o pîlnie inversată. Se lasă apoi să sedimenteze o zi sau două.

Se centrifughează iar supernatantul obținut, diluat ulterior în mod adecvat cu NaCl 0,25%, va constitui substratul.

Pentru a găsi diluția potrivită trebuie determinat conținutul în amidon al acestei soluții stoc, după cum urmează :

Într-o eprubetă mare (25 × 200 mm) se introduc 5 ml soluție stoc și 1 ml HCl 3 N. Eprubeta se astupă cu un dop de cauciuc prevăzut cu un tub de sticlă care va avea rolul unui condensator cu reflux, și se introduce într-o baie de apă la fierbere, unde se ține 2 ore și jumătate.

Hidrolizatul se neutralizează cu NaOH, folosind ca indicator roșu fenol.

Se diluează la 100 ml și se determină conținutul în glucoză. Acesta, înmulțit cu 0,9, reprezintă conținutul în amidon al soluției stoc și servește ca bază pentru diluție. De exemplu, dacă a fost găsită o concentrație de amidon de 0,428%, se introduc într-un cilindru gradat 75 ml soluție stoc și se diluează pînă la 428 ml cu NaCl 0,25%. Soluția astfel diluată conține 75 mg amidon și 250 mg NaCl%.

Toate operațiile trebuie efectuate aseptic.

Unitățile de activitate amilazică, se calculează după cum urmează :

$$\text{Unități Somogyi/100 ml} = \frac{\text{Factorul Somogyi}}{\text{Minutele necesare pentru a atinge sfîrșitul reacției}}$$

Factor: 1 800 pentru o incubare la 37°.
1 600 pentru o incubare la 40°.

Valori normale: 80-150 unități Somogyi/100 ml ser.

Valori crescute ale amilazei serice se observă în: pancreatita acută (în primele 72 de ore), carcinom al capului de pancreas, obstrucție intestinală, hipertiroidism, afecțiuni renale.

Valori scăzute găsite în: ciroză, abces sau carcinom hepatic, hepatite, toxemii gravidice, alcoolism acut.

Lipaza

Este enzima care hidrolizează grăsimile în acizi grași și glicerol. Cantitatea de acizi grași formați se determină prin titrare cu hidroxid de sodiu.

Trebuie evitată hemoliza serului.

Reactivi: 1. Într-un balon cu agitator se emulsionează:

Ulei de măsline	100 g
Benzoat de sodiu	0,2 g
Gumă arabică	5 g
Apă distilată	100 g

Emulsia trebuie păstrată la rece. Ea trebuie reînnoită în momentul separării uleiului. Se agită puternic înainte de întrebuințare.

2. Tampon Tris 0,2 M. pH = 8.
3. NaOH 0,05 N.
4. Timolftaleină 1% în alcool 95%.
5. Alcool etilic 95%.

Tehnica. Reacția se efectuează în baloane Erlenmeyer mici de 25 ml sau 50 ml.

	Proba	Martorul
Apă distilată	2,5 ml	2,5 ml
Tampon	1 ml	1 ml
Emulsie	3 ml	3 ml
Ser	1 ml	—

Se amestecă bine conținutul balonașelor, se astupă și se pun la incubat la 37° timp de 6 ore.

După acest interval de timp, în proba martor se adaugă 1 ml ser. Se adaugă apoi imediat, atît în martor, cît și în probă, cîte 3 ml alcool etilic 95% și cîte 4 picături indicator. Se titrează cu NaOH 0,05 N pînă la apariția unei culori albastru deschis.

Numărul de unități de activitate lipazică pe 1 ml ser se obține scăzînd din numărul de ml NaOH folosiți pentru titrarea probei numărul de ml NaOH folosiți la titrarea martorului.

Valori normale: 1,5 u./ml ser.

Valori crescute se găsesc în:

1. Pancreatite.
2. Obstrucții ale canalului pancreatic.
3. În aproximativ 50% din cazurile de carcinom al pancreasului sau carcinom al ampulei Vater.
4. Uneori valori ridicate se găsesc în afecțiunile renale (retenție de lipază), obstrucții intestinale și ulcer duodenal.

Determinarea lipazei

Metoda Carnot și Maubau. Principiul acestei metode constă în titrarea acizilor grași liberi cu soluție de NaOH N/10 în prezența fenolftaleinei ca indicator.

Reactivi: 1. Ulei de măsline neutralizat.
2. Hidrat de sodiu N/10.
3. Fenolftaleină 1%.

Tehnica. Proba nr. 1. Într-un balon Erlenmeyer se pun 10 ml ulei de măsline și 2 ml lichid pancreatic și se adaugă imediat 10 ml alcool 96°.

Amestecul este titrat cu NaOH N/10, pînă la apariția culorii roz-roșu în prezența fenolftaleinei.

Proba nr. 2. Într-un balon Erlenmeyer se pun 10 ml ulei de măsline și 2 ml lichid pancreatic. Se ține amestecul o oră la 37° și se tratează apoi cu 10 ml alcool 96°. Aciditatea este titrată cu NaOH N/10, ca la proba nr. 1.

Diferența dintre numărul de ml de NaOH N/10 utilizați la titrarea probei nr. 1 și la titrarea probei nr. 2 reprezintă activitatea lipazică. Ea este cuprinsă, în mod normal, între 50 și 60 ml hidrat de sodiu N/10 la 100 ml suc pancreatic.

Metoda Rone Michaelis. Lipaza acționează asupra unei soluții de tributirină, eliberînd acidul gras care, la rîndul lui, modifică tensiunea superficială a soluției. Tensiunea superficială se măsoară stalagmometric, iar variația ei este proporțională cu cantitatea de grăsime hidrolizată.

Reactivi: 1. Soluție tampon fosfat pH 8.

2. Soluție saturată de tributirină. 100 ml apă + 8 ml tampon pH 8 + 25 de picături de tributirină; amestecul se agită 60 de minute, se lasă în repaus 24 de ore și apoi se filtrează prin hîrtie de filtru, aruncîndu-se primele și ultimele porțiuni filtrate.

Soluția se conservă maximum 4 zile la +4°.

Curba de etalonare. Se obține prin diluția soluției saturate de tributirină considerată 100% cu apă distilată care conține 8% tampon, după tabelul următor.

Nr. tubului	1	2	3	4	5	6	7
ml soluție saturată de tributirină	10	8	6	4	2	1	0
ml apă distilată cu 8% tampon	0	2	4	6	8	9	10
Concentrația în tributirină	100	80	60	40	20	10	0

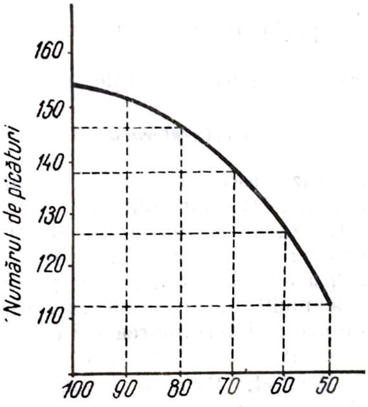


Fig. 122. — Curba de etalonare a tributirinei cu stalagmometrul Traube.

Se încarcă stalagmometrul cu amestecul respectiv și se determină numărul de picături pe minut al fiecărui amestec, începînd cu tubul nr.7. Pe o hîrtie milimetrică se înscriu, într-un sistem de coordonate, datele căpătate, stabilindu-se astfel curba de etalonare a soluției de tributirină pentru stalagmometrul respectiv.

De exemplu:

— la o concentrație de 100% corespund 155 de picături/min.

— la o concentrație de 80% corespund 146 de picături/min.

— la o concentrație de 60% corespund 134 de picături/min.

— la o concentrație de 40% corespund 125 de picături/min.

— la o concentrație de 20% corespund 108 picături/min.

— la o concentrație de 0% apă + tampon corespund 90 de picături/min.

Tehnica. Într-un balon Erlenmeyer de 50 ml se face un amestec de 1 ml ser + 8 ml soluție tributirină + 1 ml soluție tampon. Se agită balonul 1 minut, pentru omogenizarea amestecului, cu care se încarcă imediat stalagmometrul și se face o numărătoare a picăturilor. Restul de amestec este ținut la 37°, iar la 60 de minute se reumple stalagmometrul cu amestec și se face numărătoarea picăturilor.

Calcul. Numărul de picături obținute la 15, 30 și 60 de minute sînt raportate la curba de etalonare.

În afecțiunile pancreatice acute, numai creșterea amilazei sanguine este specifică.

Creșterea activității lipazei în serul sanguin se întîlnește și în distrugerile de țesut gras, fracturi osoase, leziuni traumatice ale părților moi, tuberculoză incipientă și uneori în diabet și în rahitism.

Valori normale: 1 ml ser la 60 de minute = = 70—85% tributirină.

Valori crescute: 1 ml ser la 60 de minute = = 40—60% tribu ritină.

Determinarea tripsinei

Tripsina este fermentul proteolitic care continuă digestia începută în stomac a substanțelor proteice pînă în stadiul de polipeptide și acizi aminați.

Metoda calitativă se bazează pe acțiunea tripsinei asupra soluției de gelatină 5%.

Tehnica. Într-o cutie Petri se toarnă 20 ml soluție fierbinte de gelatină 5%. După răcire, pe suprafața plăcii se picură în locurile dinainte stabilite cîte o picătură din diluțiile 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32...1/350 ale lichidului pancreatic. Se lasă placa în reapus 24 de ore, la 37°. Acțiunea tripsinei este constatată prin formarea godeurilor pe suprafața gelatinei.

Metoda Gross-Michaelis. Soluția limpede de cazeină se tulbură prin adăugarea de alcool-acid. Sub acțiunea tripsinei, cazeina este hidrolizată în acizi aminați, așa încît nu se mai tulbură după adăugarea de alcool-acid.

Reactivi: 1. Soluție de cazeină: 0,1 g cazeină se dizolvă în 95 ml apă + 5 ml NaOH 1%. Se încălzește pe baia de apă la 100°, pînă la limpezire.

2. Alcool-acid: 5 ml acid acetic glacial + + 45 ml H_2O + 50 ml alcool.

3. Tampon 7,8—8, fosfat M/15.

Tehnica. În 10 eprubete se fac diluții succesive din lichidul de cercetat (urină, ser, suc duodenal sau suc pancreatic), pentru a obţine 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512. În eprubeta nr. 11 se pune numai soluţia de cazeină pentru control.

Se adaugă în fiecare tub 2 ml soluţie de cazeină + 1 ml soluţie tampon. Se ţine o oră la 37°. Se scot tuburile de la termostat şi se adaugă în fiecare eprubetă cîte 6—7 picături de alcool acetic. Începînd cu ultimul tub, se notează prima eprubetă care rămîne limpede.

Unitatea triptică este cantitatea de ferment capabilă să hidrolizeze 1 mg cazeină în timp de o oră.

Exemplu. Eprubeta nr. 5 cu diluţia 1/16 este clară: s-au hidrolizat complet 2 mg cazeină într-o oră, la 37°. Diluţia 1/16 conţine deci 2 unităţi triptice. Înmulţind 2 unităţi cu gradul diluţiei, se obţine acţiunea în unităţi triptice.

$$\text{Acţiunea tripsinei}\ \frac{37^\circ}{10\ \text{minute}} = 32\ \text{unităţi triptice.}$$

Determinarea tripsinei în ser nu este concludentă, deoarece sîngele conţine o antitripsină. Este mai util testul antitrombinei (vezi hematologie).

Pentru mărirea sensibilităţii metodei, se poate urmări activitatea triptică titrimetric sau colorimetric.

După adăugarea de acid-alcool, seria de tuburi de mai sus sînt centrifugate 30 de minute la 3 000 t/min., iar în supernatant se dozează aminoacizii după metoda Sörensen sau colorimetric, după metoda Stein.

Cercetarea erepsinei

Erepsina scindează albumozele, peptonele şi polipeptidele la pH = 7,8, pînă la stadiul de acizi aminaţi. Pe această însuşire se bazează următoarea metodă de determinare.

Reactivi: 1. Soluţie de peptonă 2%.
2. Soluţie de sulfat de cupru 0,1%.
3. Soluţie de NaOH 40%.
4. Soluţie de NaCl 10‰.

Tehnica. În două eprubete se pun cîte 5 ml suc duodenal, plus 2 ml din soluţia de peptonă 2%.

Una din eprubete este inactivată prin fierbere pe baia de apă 5 minute şi serveşte drept martor. În ambele eprubete se adaugă cîteva picături de toluen, se închid bine şi sînt lăsate 24 de ore la 37°. Din fiecare eprubetă se iau cîte 2 ml de amestec incubat şi li se adaugă cîteva picături de acid acetic şi 1 ml soluţie de clorură de Na. Eprubetele se fierb 20 de minute pentru deproteinizare, apoi sînt centrifugate la 3 000 t/min. Supernatantului i se adaugă 1 ml soluţie de NaOH 40% + 2—3 picături dintr-o soluţie de SO_4Cu 0,1%.

În prezenţa peptonei apare o coloraţie roşie-violetă. În prezenţa aminoacizilor nu se obţine o culoare. Dacă în proba de cercetat culoarea este mai puţin intensă decît în proba martor, este un indiciu pentru o scindare parţială a peptonei.

Rezultate: Lipsa de culoare = reacţie pozitivă ++.
Culoare puţin intensă = reacţie slab pozitivă +.
Culoare roşu-violet = reacţie negativă.

Colinesteraza

Colinesteraza este enzima care catalizează descompunerea esterilor colinei.

Colinesteraza sanguină este alcătuită din două enzime: colinesteraza specifică din eritrocite şi pseudocolinesteraza din plasmă. Ambele suferă modificări în cursul afecţiunilor hepatice, de aceea determinarea lor constituie un test important.

Metoda Michel. Este o *metodă titrimetrică* care se bazează pe proprietatea enzimei de a hidroliza acetilcolina în colină şi acid acetic şi apoi pe dozarea volumetrică a acidului acetic cu hidroxid de sodiu N/100.

Reactivi: 1. Acetilcolină 1,5% în tampon fosfat pH 8.
2. Hidroxid de sodiu N/100.
3. Fenolftaleină 1%.

Tehnica. În două eprubete se repartizează cîte 1 ml acetilcolină. Într-una se măsoară 1 ml ser şi se lasă 1/2 oră la 37°. În cealaltă se măsoară 1 ml ser inactivat 1/2 oră la 56°. Se adaugă în ambele eprubete cîteva picături de fenolftaleină şi apoi fiecare probă se titrează cu hidroxid de sodiu N/100.

Calcul. Numărul de ml de hidroxid de sodiu N/100 întrebuinţaţi la titrarea probei martor se scad din numărul de ml de hidroxid de sodiu N/100 întrebuinţaţi la titrarea probei.

Normal: 2—4 ml NaOH N/100 întrebuinţaţi la titrare.

Activitatea colinesterazei scade în leziunile hepatice, iar la restabilirea funcţională a ficatului, ea revine la normal. În icterul mecanic, dozarea colinesterazei poate ajuta la determinarea naturii obstacolului, ea fiind scăzută sau normală în icterul litiazic şi crescută în icterul prin neoplasm de cap de pancreas. Scăderea progresivă a colinesterazei în cursul unei hepatite şi menţinerea ei la un nivel coborît indică constituirea unor leziuni ireversibile.

Catalaza

Este enzima care catalizează descompunerea apei oxigenate.

Metoda Bah-Zukova. Se bazează pe descompunerea unei cantităţi de apă oxigenată de către catalaza serică şi dozarea apei oxigenate rămasă nedescompusă.

Reactivi : 1. Tampon fosfat pH 6,8.
2. Apă oxigenată M/100 în tampon fosfat.
3. Acid sulfuric 20%.
4. Permanganat de potasiu M/10.

Tehnica. 0,1 ml sînge total se pune într-un balon cotat de 100 ml, se adaugă 1 ml apă distilată pentru hemoliză şi apoi se completează la semn cu tampon fosfat pH 6,8. Din această soluţie se ia 1 ml şi se trece într-un balon care conţine 20 ml soluţie de apă oxigenată M/100. Paralel, într-un alt balon care conţine 20 ml soluţie de apă oxigenată se adaugă 1 ml din proba diluată, inactivată 10 minute la 100° şi care constituie proba martor. Cele două baloane se lasă într-o baie de gheaţă timp de 30 de minute, apoi se adaugă pentru oprirea reacţiei cîte 10 ml SO_4H_2 20%. Ambele probe se titrează cu soluţie de permanganat de potasiu M/10. Activitatea catalazică se exprimă în procente de apă oxigenată descompusă.

Valori normale = 50%.

În afecţiunile hepatice se întîlnesc aproximativ în 80% din cazuri valori scăzute ale activităţii catalazei serice.

Valori normale ale enzimelor serice

Enzima	Metoda de dozare	Modul de exprimare a activităţii enzimatice	Valori normale
Aldolaza	Bruns şi Puls	Activitatea enzimatică se exprimă în unităţi extincţie care corespund transformării substratului HDP/0,5 ml ser/oră	
Fosfataza alcalină	1. Bodansky modificată	1 unitate Bodansky = activitatea enzimatică raportată la 100 ml ser, care eliberează 1 mg P într-o oră la 37°. pH = 9,6 din substratul de β-glicerofosfat.	Adult, 2—4 u.B. Copii 5—15 u.B.
	2. Folley şi Kay	Activitatea enzimatică, raportată la 100 ml ser, se exprimă în mg P eliberat în 3 ore la 37°	3,2—7,9 mg P la 100 ml ser
	3. Bessey	1 unitate Bessey = activitatea enzimatică raportată la 1 ml ser, care eliberează 1 µM P nitrofenol într-o oră în condiţiile de lucru	Adult 0,8—2,3 u. Copii 2,8—6,7 u.
Fosfataza acidă	1. Bodansky modificată	Acelaşi mod de exprimare ca la fosfataza alcalină	0—0,64 u.B.
	2. Folley şi Kay	Acelaşi mod de exprimare ca la fosfataza alcalină	0—0,5 mg P/100 ml ser
	3. Bessey	Acelaşi mod de exprimare ca la fosfataza alcalină	Bărbat, 0,13—0,63 u./ml ser Femei, 0,01—0,56 u./ml ser

(continuare la tabel)

Enzima	Metoda de dozare	Modul de exprimare a activităţii enzimatice	Valori normale
Fosfataza acidă de origine prostatică	Bessey	Acelaşi mod de exprimare ca la fosfataza alcalină	0,01–0,15 u./ml
Fosfohexozoizomeraza	Bodansky	1 unitate Bodansky = reciproca acelei concentraţii de ser care duce la formarea a 25 μg fructoză în 30 de minute	8–40 u.B.
Glucozo-6-fosfatdehidrogenaza		1 unitate = activitatea enzimatică care produce o creştere a densităţii optice de 0,001/min./ml ser	0–30 u./ml ser
Lacticdehidrogenaza	1. Wacker-Ulmer 2. Metoda modificată	1 unitate = activitatea enzimatică care produce o creştere a densităţii optice de 0,001/min./ml ser	1. 59±19 u./ml ser 2. 20–60 u./ml ser
Izocitric-dehidrogenaza	Taylor-Friedmann	1 unitate = activitatea enzimatică care duce la formarea unui milmicromol de acid α-cetoglutaric într-o oră, la 37°	Adult, 50–275 u./ml ser Copii, 179–475 u./ml ser
Malicdehidrogenaza	1. Bring 2. Metoda modificată	1 unitate = activitatea enzimatică care produce o creştere a densităţii optice de 0,001/min./ml ser	1. 50–10 u./ml ser 2. 70 u./ml ser
Transaminaza	Karmen	1 unitate Karmen = activitatea enzimatică raportată la 1 ml ser care duce la formarea a $\frac{1}{15}$ μ moli piruvat într-o oră, la 37°	T G O 22±12 T G P 16 ± 8
Ornitincarbamiltransferaza	Reichard	Activitatea enzimatică se exprimă prin numărul de micromoli de amoniac format, pe 0,5 ml ser	0–0,25 μ M NH_3/0,5 ml ser
Polipeptidaza	1. Scheige titrimetrică 2. Scheige colorimetrică	Activitatea enzimatică raportată la 1 ml ser se exprimă prin numărul de ml KOH N/100 necesar pentru neutralizarea grupărilor carboxil formate Activitatea enzimatică raportată la 1 ml ser se exprimă prin cantitatea de triptofan eliberată	1–2,5 ml KOH N/100 – sau ±
Leucinaminopeptidaza	Rutenberg-Goldbarg	1 unitate = activitatea enzimatică care duce la formarea a 0,0417 μg β-naftilamină într-o oră, la 37°	70–200 u./ml ser diluat 1/50

(continuare la tabel)

Enzima	Metoda de dozare	Modul de exprimare a activității enzimatice	Valori normale
Amilaza	1. Wohlgemuth 2. Somogyi	1 unitate Wohlgemuth = activitatea enzimatică care catalizează hidroliza a 1 mg amidon în 30 de minute la 37° pînă la stadiul de dextrină. Activitatea enzimatică se exprimă în timpul necesar pentru a hidroliza o anumită cantitate de substrat pînă la stadiul de dextrină	32 u.W. 80—150 u.Somogyi/ /100 ml ser
Lipaza	Cherry-Grandall-Tietz	Activitatea enzimatică se exprimă prin numărul de ml NaOH 0,05 N necesari pentru neutralizarea acizilor grași eliberați din 3 ml substrat de către 1 ml ser	$<$ 1,5 ml NaOH 0,05 N/ml ser
Colinesteraza	Michel	Activitatea enzimatică se exprimă în numărul de ml de NaOH n/100 necesari pentru neutralizarea acidului acetic eliberat în urma hidrolizei acetilcolinei	2—4 ml NaOH n/100/ml ser
Catalaza	Bah-Zubkova	Activitatea catalazică se exprimă în procente de apă oxigenată descompusă	50%

COMPONENTE ORGANICE

Dozarea acidului uric în ser

Micrometoda Brown constă în reducerea reactivului fosfotungstic de către acidul uric. Această reducere se pune în evidență printr-o colorație albastră, a cărei intensitate este proporțională cu cantitatea de acid uric din ser.

Reactivi : 1. Reactiv fosfotungstic : într-un balon de 500 ml spălat cu amestec oxidant se pun 50 g tungstat de Na pur și 10 g fosfat disodic anhidru. Se adaugă 100 ml apă și se încălzește pînă la dizolvare. Se adaugă apoi un amestec de 12,5 ml H_2SO_4 (D = 1,84) și 50 ml apă. Se adaptează balonului un refrigerent cu reflux și se fierbe ușor o oră. După răcire se completează la 500 ml. Acest reactiv trebuie să fie incolor, să nu reacționeze cu soluția de cianură-uree; în caz că se produce o colorație, se adaugă 3—5 picături brom și se fierbe cîteva minute.

2. Soluție de cianură-uree : se amestecă în momentul întrebuințării părți egale din soluția de cianură și de uree.

3. Soluție de cianură de Na 12%.

4. Soluție de uree 50%.

5. Soluție de stoc de acid uric : într-un balon de 1 000 ml se pun 0,200 g acid uric, la care se adaugă o soluție caldă de CO_3Li, 0,30 g în 100 ml apă. Se agită pînă la dizolvare, se răcește și se adaugă 200 ml apă, 20 ml formol 40% și 15 ml H_2SO_4 N. Apoi se aduce la 1 000 ml cu apă distilată. Reactivul se păstrează la întuneric.

6. Soluție standard de acid uric (1 : 50 din soluția stoc) : 2 ml soluție stoc sînt completate pînă la 100 ml cu apă distilată. Această soluție conține 4 mg acid uric/1 000 ml și poate fi conservată la gheață o săptămînă.

7. Tungstat de Na 10%.

8. H_2SO_4 2/3 N.

Tehnica. Într-un tub de centrifugă se măsoară 0,1 ml ser + 1,5 ml apă distilată +

+0,2 ml tungstat de sodiu + 0,2 H_2SO_4 2/3 N. Amestecul se agită şi se centrifughează.

Din supernatant se ia 1 ml, la care se adaugă 1 ml apă distilată + 4 ml soluţie de uree-cianură + 1 ml reactiv fosfo-tungstic. Se ţine în repaus 20 de minute la temperatura laboratorului. Se completează la 10 ml cu apă distilată şi se citeşte la fotocolorimetrul Pulfrich cu λ = 680 mμ.

Dozarea acidului uric se recomandă să se efectueze pe ser proaspăt. După deproteinizare se poate conserva la gheaţă fără a se modifica rezultatele.

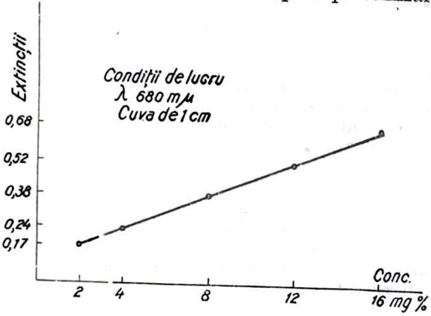


Fig. 123. — Curbă etalon pentru acidul uric în sînge.

Curba etalon. Se obţine tratînd în aceleaşi condiţii următoarele diluţii preparate din soluţia standard : 0,25, 0,50, 1, 1,5 şi 2 ml.

Valori normale: 0,025—0,045 g‰.

Metoda L. Heilmeyer, W. Krebs. Acidul uric dă cu reactivul fosfotungstic o coloraţie albastră, a cărei intensitate este proporţională cu concentraţia acidului uric în proba de analizat.

Reactivi : 1. Acetat de uranil 1,5% sau acid triclor-acetic 20%.

2. Carbonat de sodiu cristalizat 22%.

3. Reactiv fosfowolframic.

Într-un balon de 500 ml la care se adaptează un refrigerent cu reflux se pun 50 g tungstat de sodiu, 40 ml H_3PO_4 85% (D = 1,71) şi 350 ml apă. Amestecul se fierbe cel puţin 2 ore. După răcire se completează cu apă pînă la 500 ml. Reactivul are o culoare verde-gălbuie.

Tehnica. 2 ml ser + 2 ml acetat de uranil sau acid tricloracetic 20% + 6 ml apă se agită puternic şi se centrifughează. Se iau 4 ml supernatant, la care se adaugă 0,2 ml reactiv fosfowolframic + 1,8 ml carbonat de sodiu 22%. Se lasă în repaus 10 minute şi apoi se citeşte la colorimetrul comparativ faţă de soluţia-etalon de acid uric sau se citeşte la fotocolorimetru cu filtrul S_{61} şi cuva de 1 cm.

Calcul = E × 13,72 mg % acid uric.

Metoda spectrofotometrică. Acidul uric reduce wolframatul de sodiu, dînd o coloraţie albastră cu maximul de absorbţie la 600—690mμ.

Reactivi : 1. Acid fosfotungstic; prepararea la fel ca la metoda Heilmeyer W.

2. Ureo-cianură : 2 g cianură de sodiu + 8 g uree sînt dizolvate în 18 ml apă distilată. Se întrebuinţează totdeauna soluţii proaspete.

3. Acid sulfuric N/10.

4. Wolframat de sodiu 10%.

5. Acid uric 1 mg/ml. 1 g acid uric se dizolvă în 500 ml soluţie carbonat de litiu 0,1 g%. Se adaugă 20 ml formaldehidă 40% şi 25 ml acid sulfuric normal. Acidul sulfuric se adaugă încetul cu încetul. Se completează pînă la semn cu apă distilată. Soluţia astfel preparată se păstrează la +4° timp indefinit.

Din soluţia 1 mg/ml se obţin soluţiile cu 0,005 mg/ml şi 0,0025 mg/ml acid uric. Soluţiile diluate nu se conservă la +4° mai mult de 10—15 zile.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 8 ml acid sulfuric N/10, plus 1 ml ser sau plasmă. Apoi se adaugă 1 ml soluţie de wolframat de sodiu 10%. Se amestecă bine, se centrifughează. În supernatant se dozează acidul uric.

O dată cu proba, în 4 cilindre gradate, numerotate cu 1, 2, 3 şi 4 se măsoară :

	1	2	3	4
	ml			
Supernatant	1	—	—	—
Apă distilată	6	7	6	6
0,005 mg/ml acid uric	—	—	1	—
0,0025 mg/ml acid uric	—	—	—	1
Uree-cianură	2	2	2	2
Acid fosfowolframic	1	1	1	1

Se agită eprubetele, iar după 30 de minute, la întuneric, se fac citirile la spectrofotometru. Cu proba nr. 2 se egalează aparatul la punctul „0" şi apoi se măsoară absorbţia soluţiilor 1, 3 şi 4. De obicei se foloseşte numai soluţia de comparaţie, care este cea mai apropiată probei din punctul de vedere al absorbţiei.

$$\text{mg acid uric } \%\,\text{ml} = 5 \times \frac{\text{absorbţia probei}}{\text{absorbţia soluţiei de comparat nr. 3}}$$

sau

$$\text{mg acid uric \% ml} = 2{,}5 \times \frac{\text{absorbția probei}}{\text{absorbția soluției de comparat nr. 4}}$$

Dozarea acidului uric în sînge

Metoda Folin se bazează pe reacția de culoare pe care o dă acidul uric cu reactivul fosfotungstic.

Reactivi: 1. Acid sulfuric N/10.
2. Wolframat de sodiu 10%.
3. Reactivul fosfotungstic.
4. Carbonat de sodiu 22%.

Tehnica. La 2 ml sînge se adaugă 16 ml SO_4H_2 N/10 și 2 ml wolframat de sodiu 10%. După 5 minute se filtrează. Se iau 10 ml filtrat, se pun într-un balon cotat de 25 ml, se adaugă 0,3 ml reactiv fosfowolframic și 5 ml Na_2CO_3 22%, se aduce cu apă la semn. Citirea se face după 5 minute cu filtru S_{61}, cuva 5 cm.

Lichid de referință, apa
mg % acid uric = E × 10,6.

Valori normale: pentru adult, 30—65 mg acid uric ‰;
pentru copii, 10—35 mg acid uric ‰.

Valori crescute: în nefrite acute sau subacute, gută, leucemii, anemii pernicioase, tuberculoză renală, artrite deformante, eclampsii, decompensări cardiace și intoxicații cu plumb.

Dozarea creatininei și a creatinei

Creatinina în mediu alcalin reduce acidul picric în acid picramic de culoare galbenă-roșiatică (reacția Joffé), a cărei intensitate este proporțională cu concentrația creatininei din proba de cercetat.

Reactivi: 1. Soluție saturată de acid picric. Se dizolvă 1,2 g acid picric în 100 ml apă distilată. Se fierbe pînă la dizolvare și apoi se lasă să se răcească.

2. Hidroxid de sodiu 10%.

3. Picrat de sodiu: într-un balon de 100 ml se măsoară 25 ml acid picric soluție saturată și 5 ml hidrat de sodiu 10%; se agită pentru omogenizare și apoi se completează la semn cu apă distilată. Reactivul se prepară în ziua întrebuințării.

4. Wolframat de sodiu 10%.

5. Acid sulfuric 2/3 N: 20 ml acid sulfuric concentrat p.a. sînt diluați la 1 000 ml cu apă distilată.

6. Soluție etalon de creatinină 0,1 g%: se dizolvă 0,1 g creatinină în 100 ml ClH N/10. Soluția se păstrează într-o sticlă bine închisă la 4° sub toluol.

7. Acid clorhidric N.

Tehnica. Deproteinizarea se face cu wolframat de sodiu 10% și acid sulfuric 2/3 N. Într-o eprubetă se măsoară 2,5 ml ser, plasmă sau sînge oxalatat, 5 ml apă distilată, 2,5 ml wolframat de sodiu 10% și 2,5 ml acid sulfuric 2/3 N. Se agită și după 20 de minute se centrifughează. Din supernatant se măsoară 2,5 ml pentru dozarea creatininei libere și 2,5 ml pentru dozarea creatininei totale (creatinină plus creatina).

Dozarea creatininei libere: Într-o eprubetă se măsoară 2,5 ml supernatant și 5 ml picrat de sodiu + 0,5 ml NaOH 10%. După 10 minute se adaugă 4,5 ml apă distilată și se citește după 5 minute la fotocolorimetrul cu filtrul S_{53} și cuva 2 cm față de apă distilată.

Calcul: mg % creatinină = E × 32,5.

Dozarea creatininei totale. La 2,5 ml supernatant se adaugă 1 ml acid clorhidric N. Se autoclavează la 130° timp de 20 de minute pentru a transforma creatina în creatinină. După răcire se centrifughează; supernatantului i se adaugă 5 ml picrat de sodiu 0,5 ml Na OH 10%. După 10 minute de la adăugarea picratului de sodiu se adaugă 3,5 ml apă distilată și se citește după 5 minute la fotocolorimetrul cu filtrul S_{53} și cuva 2 cm față de apă distilată.

Calcul: mg % creatinină = E × 32,5.

Valori normale: creatinină totală = 5—6 mg % ml ser
creatinină liberă = 1—2 mg % ml ser.

Creatina și creatinina

Metoda spectrofotometrică se bazează pe același principiu ca și metoda fotocolorimetrică.

Creatinina cu soluția alcalină de picrat formează un produs de culoare roșie. Pentru a determina indirect creatina, plasma, serul sau urina sînt tratate cu acid sub presiune în autoclavă. În acest caz, cantitatea de creatină se calculează din cantitatea totală de creatinină.

Reactivi: 1. Acid sulfuric N/12.
2. Wolframat de sodiu 10%.
3. Acid picric 1,1%.
4. Hidroxid de sodiu 2,5 N.

Reactivul picric: într-un balon cotat de 100 ml se amestecă 50 ml soluţie de acid picric 1,1 % cu 10 ml hidroxid de sodiu 2,5 N. Reactivul se prepară cu 10 minute înainte de întrebuinţare.

5. Creatinină. Soluţia stoc conţine 1 mg creatinină/ml. 160 mg clorură de zinc-creatinină sînt dizolvate în 50 ml apă distilată, la care s-a adăugat 0,85 ml acid clorhidric concentrat. Se poate păstra soluţia timp nelimitat în prezenţa a cîteva picături de toluol. Soluţiile diluate cu care se construieşte curba etalon trebuie preparate chiar înainte de întrebuinţarea lor. Soluţiile diluate se lucrează în aceleaşi condiţii ca şi probele.

Tehnica. Deproteinizarea sîngelui sau a serului : la 16 ml acid sulfuric N/12 se adaugă 2 ml ser sau plasmă, plus 2 ml wolframat de sodiu 10%. Se amestecă şi apoi se centrifughează. Din supernatant se iau 5 ml pentru determinarea creatinei şi 5 ml pentru determinarea creatininei şi creatinei. Pentru determinarea creatininei plus creatina se tratează 5 ml supernatant cu 1 ml acid clorhidric N şi se autoclavează 30 de minute la 130°. După răcire, la ambele probe se adaugă cîte 2,5 ml reactiv picric şi apoi se aduc la volum de 25 ml cu apă distilată. Citirile se fac la lungimea de undă de 520 mμ, cuva de 1 cm.

Deproteinizarea urinii : într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 2 ml urină filtrată cu 16 ml acid sulfuric N/12 şi 2 ml wolframat de sodiu 10%. Se centrifughează şi din supernatant se iau 5 ml pentru determinarea creatininei şi 5 ml pentru determinarea creatinei şi creatininei.

Se măsoară în două baloane cotate de 50 ml cîte 5 ml supernatant. În prima probă se determină creatinina, iar în a doua probă se determină creatinina şi creatina. În acest scop, la proba numărul 2 se adaugă 1 ml acid clorhidric N şi se autoclavează 30 de minute la 120°. După răcire, ambele probe se completează la semn cu apă distilată.

Tehnica. La 5 ml supernatant se adaugă 2,5 ml reactiv picric proaspăt preparat. Se agită şi după 15 minute se măsoară absorbţia. Aparatul se egalează cu proba martor, care conţine 5 ml apă distilată plus 2,5 ml reactiv picric. Lungimea de undă se reglează la 520 mμ.

Cantitatea de creatinină se calculează din curba etalon.

Valori crescute în alterarea funcţiei renale, creşterea creatininei, se observă în cazuri de retenţii urinare şi în decompensări cardiace. Dozarea creatininei este considerată ca un test sensibil în insuficienţa renală, deoarece în insuficienţele renale incipiente se observă o creştere a cantităţii de creatinină.

Cercetarea substanţelor aromatice

Reacţia xantoproteică. Substanţele cu nucleu aromatic din sînge dau cu acidul azotic la cald, în mediul alcalin, o coloraţie galbenă, care se compară cu o soluţie etalon de bicarbonat de potasiu.

Reactivi : 1. Acid tricloracetic 20%.

2. Acid azotic fumans (D = 1.40).

3. Hidrat de sodiu 33%.

4. Soluţia standard de bicromat de potasiu 0,38 g %. În momentul întrebuinţării se diluează soluţia standard 1/100 pentru obţinerea unei concentraţii de 3,87 mg%.

Tehnica. La 2 ml ser se adaugă 2 ml acid tricloracetic, se agită şi se centrifughează. Lichidul defecat este tratat cu 0,5 ml acid azotic concentrat. Se fierbe 30 de secunde. După răcire se adaugă 1,5 ml hidrat de sodiu. Apare o coloraţie galbenă, care se compară la colorimetru faţă de soluţia 3,87 mg% bicromat de potasiu sau se notează intensitatea culorii cu +, ++.

Valori intens pozitive se întîlnesc în leziunile renale, în intoxicaţiile cu fenol şi preparate salicilice şi în nefrita acută. Dacă în nefrita acută nu se constată o scădere a cantităţii de urină, iar reacţia xantoproteică este net pozitivă, acest fapt este un indiciu al trecerii într-o formă subacută. Proba xantroproteică are importanţă mare în diagnosticul uremiei.

Determinarea indicanului

Indoxilul oxidat în mediu acid dă o culoare albastră solubilă în cloroform.

Reactivi : 1. Acid tricloracetic 20%.

2. Soluţie de timol 5 % în alcool 95°.

3. Reactiv Obermeyer. Acid clorhidric concentrat cu 5% clorură ferică.

4. Cloroform.

5. Soluţie standard de indican.

Metoda calitativă. Se iau 2 ml ser + 2 ml acid tricloracetic. Se agită şi se centrifughează. La 3 ml ser defecat se adaugă 7 picături soluţie de timol 5% în alcool + 3 ml acid clorhidric cu clorură ferică. Se amestecă bine, iar după 2 ore de repaus se adaugă amestecului format 2 ml cloroform. În condiţii normale (indican sub 0,045 mg%), cloroformul nu se colorează. În stări patologice, cloroformul se colorează în roz-violet. Intensitatea culorii este proporţională cu cantitatea de indican prezentă şi se notează cu +, ++, +++.

Metoda cantitativă foloseşte aceiaşi reactivi ca şi metoda calitativă.

Tehnica. Se amestecă volume egale de ser cu acid tricloracetic 20%, se centrifughează. Supernatantul se repartizează într-o serie de eprubete în cantităţile următoare: 6, 4, 2,5, 2 şi 1 ml. Se completează pînă la 10 ml fiecare eprubetă cu apă distilată şi se adaugă 1 ml soluţie alcoolică de timol 5% + 10 ml reactiv Obermeyer. După 20 de minute se tratează fiecare eprubetă cu 2 ml cloroform. Se agită şi se lasă seria de eprubete în repaus 2 ore. Se stabileşte cantitatea cea mai mică de filtrat care dă o reacţie pozitivă şi care conţine 0,003 2 mg indican.

Calcul. Dacă eprubeta cu 2 ml filtrat (1 ml ser) este eprubeta cu reacţia pozitivă minimă, conţine 0,003 2 mg indican. 0,003 2 mg ×1 000 = 3,2 mg indican ‰ ml ser.

Dozarea fibrinogenului

Recoltarea sîngelui pentru dozarea fibrinogenului se face pe citrat trisodic. 9 volume sînge + 1 volum citrat trisodic 3,8 %. Sîngele se centrifughează, iar pe plasma proaspătă se determină cantitatea de fibrinogen, ţinîndu-se seama de diluţiile efectuate.

Metoda de orientare se bazează pe coagularea plasmei cu trombină.

Tehnica. Se pregătesc o serie de 12 eprubete; se pun în prima eprubetă 2 ml plasmă, iar în celelalte eprubete, cîte 1 ml soluţie de clorură de sodiu 9‰. Din prima eprubetă se ia 1 ml plasmă şi se trece în eprubeta a doua; se agită eprubeta pentru a se face un amestec perfect, apoi se ia 1 ml şi se trece în următoarea eprubetă. Operaţia se repetă în acelaşi mod pînă la ultima eprubetă, din care se aruncă 1 ml de amestec.

În acest mod se obţin o serie de diluţii de la 1/1 la 1/2 050. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă 0,5 ml soluţie de trombină 50 u./ml. După o agitare puternică, eprubetele sînt lăsate să coaguleze la termostat 10—20 de minute.

Paralel cu plasma de cercetat se determină fibrinogenul dintr-o plasmă normală. Pentru a nu se face martor de fiecare dată, se standardizează soluţia de trombină şi se conservă pentru un timp limitat (10—12 zile) în stare îngheţată.

Plasma normală care conţine 3—4 g fibrinogen ‰ dă coagulare cu trombina pînă la eprubeta nr. 4.

În seria cu plasmă de cercetat, dacă se observă ultimul cheag, după eprubeta 4, adică în eprubeta 6, 7, 8, este cazul unei hiperfibrinogenemii, iar dacă este mai înainte de eprubeta 4, este cazul unei hipofibrinogenemii.

Metoda gravimetrică cu trombină. 1 ml plasmă diluată cu 4 ml ser fiziologic sînt trataţi cu 2 ml trombină (aproximativ 50 u./ml). Amestecul se agită şi apoi este lăsat 30 de minute la 37° pentru formarea cheagului. Cheagul se desprinde de pe perete cu o baghetă şi se decantează serul. Cheagul este apoi spălat prin agitare de trei—patru ori cu apă distilată, de două ori cu alcool şi o dată cu eter. Cheagul poate fi spălat şi prin filtrare în modul următor: se trece cheagul pe un filtru, se spală cu multă apă, apoi cu alcool şi eter.

După spălare, cheagul este trecut pe o sticlă de ceas tarată şi se usucă la 105° pînă la pondere constantă, apoi se cîntăreşte cheagul uscat. Rezultatul obţinut se raportează la 100 ml plasmă. Se ţine seama de diluţia plasmei pe anticoagulant 1/10.

Metoda gravimetrică cu clorură de calciu. Se precipită fibrinogenul cu clorură de calciu, se filtrează, iar precipitatul se usucă şi se cîntăreşte.

Reactivi:1. Clorură de *calcium siccum* p.a. 0,28 g% (M/40).
2. Alcool.
3. Eter.

Tehnica. Se tratează 0,5 ml plasmă cu 0,5 ml soluţie de clorură de calciu M/40. Amestecul se agită, apoi este lăsat 30 de minute la 37° pentru formarea cheagului. Cheagul de fibrină se desprinde de pe perete cu o baghetă de sticlă subţire, se decantează serul exsudat şi se spală cheagul prin centrifugare cu apă distilată de 3—4 ori, apoi o dată cu acetonă, o dată cu alcool şi o dată cu eter. După spălare, cheagul este trecut, fie pe un filtru tarat, fie pe o sticlă de ceas tarată, şi se usucă la 105°, pînă la pondere constantă, apoi se cîntăreşte. Rezultatul obţinut se raportează la 100 ml plasmă. Se ţine seama de diluţia plasmei pe anticoagulant (1/10).

Cifrele normale obţinute prin metodele gravimetrice descrise sînt 2,5—4 g$^{0}/_{00}$.

Metoda gravimetrică cu sulfat de amoniu. La 0,75 ml plasmă se adaugă 0,25 ml soluţie saturată de sulfat de amoniu pH 5,8—6. Precipitatul este centrifugat şi spălat de 5—6 ori cu alcool şi eter, şi uscat la 105°. Rezultatele sînt mai mari decît în metodele precedente din cauza sulfatului de amoniu care nu se elimină în totalitate.

Metoda colorimetrică. Soluţiile alcaline de fibrină dau cu reactivul Folin-Ciocîlteu un complex colorat, a cărui intensitate este proporţională cu cantitatea de fibrinogen existentă în probă.

Reactivi : 1. Reactivul Folin-Ciocîlteu. a) Într-un balon Pyrex de 500 ml, prevăzut cu un refrigerent ascendent, se dizolvă 25 g wolframat de sodiu cu $2H_2O$ + 6,25 g molibdat de sodiu cu $2H_2O$ în 175 ml apă. Se adaugă 12,50 ml acid fosforic 85% D = 1,70 + 25 ml acid clorhidric concentrat 10 N. Amestecul este distilat 10 ore pe flacără. b) Sulfat de litiu, 37,50 g, este dizolvat în 12,50 ml apă. Se adaugă cîteva picături de brom, se fierbe soluţia 5 minute fără refrigerent şi se răceşte. Soluţia a + b se amestecă, se completează la 250 ml apă şi se filtrează.

Reactivul se păstrează la întuneric.

2. Carbonat de sodiu 20%.

3. Hidrat de sodiu 10%.

Tehnica. Se tratează 0,5 ml plasmă cu 0,5 clorură de calciu M/40 după acelaşi procedeu ca şi la metoda gravimetrică cu clorură de calciu. Cheagul de fibrină spălat cu apă, acetonă, alcool şi eter este trecut într-o eprubetă în care se măsoară 2 ml hidrat de sodiu 10%. Se fierbe 30 de minute. Fibrina este hidrolizată, punînd în libertate aminoacizi. Hidrolizatului i se adaugă 6 ml apă distilată, 1 ml reactiv Folin-Ciocîlteu diluat 1/3, 3 ml carbonat de sodiu 20%. Se agită şi se lasă în repaus timp de 10 minute. Apare o culoare albastră, care se intensifică şi este proporţională cu conţinutul în tirozină. Se centrifughează, iar supernatantul este fotocolorimetrat cu filtru S_{61}, cuva 5 cm, martorul fiind apa distilată.

Pentru stabilirea cantităţii de fibrinogen se calculează cantitatea de tirozină corespunzătoare.

Cantitatea de tirozină se determină cu ajutorul curbei etalon constituită din diluţii de tirozină pură în acid clorhidric N/10. Soluţia de plecare avînd concentraţia de 200 mg tirozină $^{0}/_{0}$, cantitatea de tirozină în mg% obţinută se înmulţeşte cu 10,7, care este echivalentul în fibrinogen al tirozinei, şi cu 2, deoarece s-a lucrat pe 0,5 ml plasmă. Rezultatul se obţine la 100 ml plasmă.

Cifrele normale obţinute prin metoda colorimetrică sînt 210—280 mg $^{0}/_{0}$.

Hemoglobină totală

Principiu. Hemoglobina cu reactivul Drabkin dă o coloraţie a cărei intensitate se măsoară la λ = 550 mμ.

Reactivul Drabkin :

1. Bicarbonat de sodiu	1 g
2. Cianură de potasiu	0,052 g
3. Fericianură de potasiu	0,198 g
4. Apă distilată ad	1 000 ml

Tehnica. Într-o eprubetă se măsoară : 0,02 ml sînge şi 5 ml reactiv Drabkin. Se agită şi se lasă amestecul 10 minute în repaus la temperatura laboratorului. Extincţia se citeşte cu filtrul S_{55}, martor fiind apa distilată.

Curba etalon. Într-o serie de 9 eprubete mici se măsoară : 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 ml sînge, a cărui concentraţie de hemoglobină este cunoscută şi se completează la 1 ml cu ser fiziologic.

Se calculează concentraţia de hemoglobină la fiecare diluţie şi din fiecare eprubetă se măsoară 0,02 ml, la care se adaugă 5 ml soluţie Drabkin.

Se lasă amestecul 10 minute la temperatura laboratorului, apoi se citeşte cu filtru S_{55}, martor fiind apa distilată.

Se notează pe hîrtia milimetrică extincţiile corespunzătoare concentraţiilor de hemoglobină cunoscute, obţinîndu-se astfel curba etalon.

Hemoglobina plasmatică

Tehnica. Într-o eprubetă se măsoară : 0,5 ml plasmă şi 4,5 ml reactiv Drabkin.

Se lasă 10 minute şi se citeşte cu filtrul S_{55}, martor fiind apa distilată.

Se întrebuinţează curba de la hemoglobina totală, iar rezultatul se împarte la 25.

Dăm în fig. 124 o curbă etalon tip pentru hemoglobină totală şi plasmatică, executată pe fotocolorimetrul Jobin-Yvon.

Curba etalon. Într-o serie de eprubete se măsoară 0,50, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25 ml sînge, a cărui hemoglobină totală este cunoscută și se completează cu apă de robinet la 340 ml volum final.

Din fiecare diluție se măsoară 1 ml, la care se adaugă 4 ml reacție Drabkin. Extincția se citește după 10 minute cu filtrul S_{55}, se notează extincțiile corespunzătoare la concentrația de hemoglobină cunoscută și apoi se construiește curba.

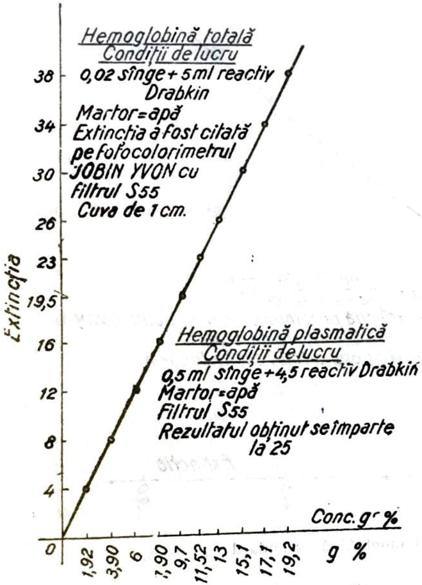


Fig. 124. — Curbă etalon pentru hemoglobina totală și plasmatică.

Dăm în fig. 125 o curbă etalon tip pentru determinarea hemoglobinei pierdute în pansamente, față de hemoglobina standard 10,5 g%. Curba a fost executată pe fotocolorimetrul Jobin-Yvon.

Calcul :

$$\frac{\text{Hemoglobina citită} \times 100}{\text{Hemoglobina bolnavului}} = \text{ml sînge pierdut}$$

COMPONENTE ANORGANICE

Dozarea amoniacului în sînge

Metoda Conway — adaptată M. Cîrje. Amoniacul sub acțiunea ionilor de hidroxil este eliberat cantitativ din soluție. În camera de difuziune se va fixa de acidul sulfuric, cu care reacționează. Sulfatul de amoniu format dă o colorație albastră cu fenolatul de sodiu în prezența hipocloritului de sodiu, formînd indofenoli. Reacția este catalizată de nitroprusiatul de sodiu.

Reactivi : 1. Apă bidistilată lipsită de amoniac : la 2 litri de apă distilată se adaugă 1,2 ml soluție de $KMnO_4$ 1% și 0,25 ml H_2SO_4 4 N. Se bidistilează în instalații de sticlă neutră.

2. Reactiv fenolic : 25 g fenol cristalizat chimic pur sînt dizolvate în circa 400 ml apă bidistilată, se adaugă apoi 0,125 g nitroprusiat de sodiu și se aduce volumul la 500 ml cu apă bidistilată. Reactivul se conservă circa o lună, în sticlă brună, la frigider.

3. Reactiv hipoclorit în mediul alcalin : 12,5 g hidroxid de sodiu p.a. sînt dizolvate în 400 ml apă bidistilată. După răcire se adaugă 1,1 g hipoclorit de sodiu 100% (calculat). Soluția conține 0,03 M în NaOCl. Se aduce soluția la 500 cu apă bidistilată. Hipocloritul de sodiu întrebuințat este STAS — 918/50. Dozarea lui se face iodometric, ca în metoda enzimatică de determinare a ureei sanguine. Reactivul se conservă în sticlă brună, la frigider.

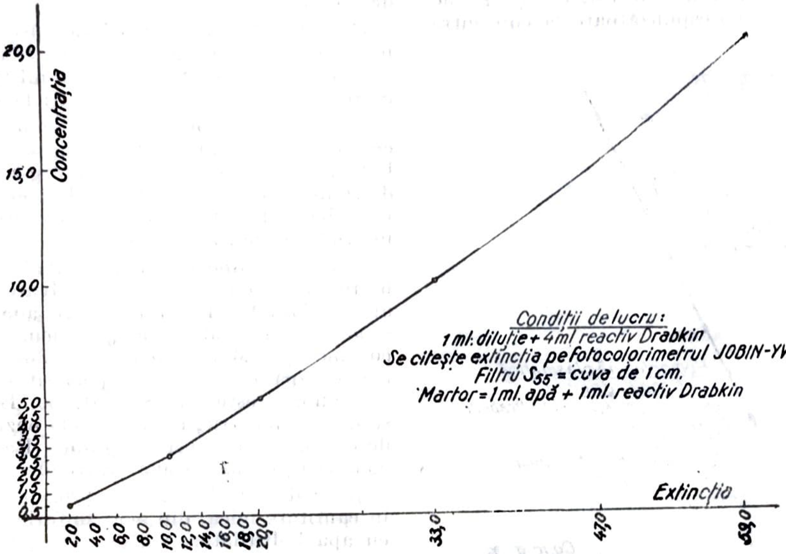
4. Acid sulfuric normal, proaspăt preparat, în cantitate mică, din acid sulfuric chimic pur cu apă bidistilată.

5. Carbonat de potasiu 50% : 100 g carbonat de potasiu chimic pur sînt dizolvate, pe baie de apă, în 100 ml apă bidistilată.

6. Sulfat de amoniu : 0,310 34 g sulfat de amoniu chimic pur sînt dizolvate în 100 ml apă bidistilată. 5 ml din această soluție se aduce la 100 cu apă bidistilată. Această soluție se folosește la construirea curbei etalon, conținînd 4 mg NH_3%.

Tehnica. Difuzia amoniacului se face într-o cutie rotundă de polistiren (ambalaj de polivitamine) de dimensiunile : Ø = 65 mm ; I = 20 mm. Capacul cutiei se așază cu partea interioară în sus. Se pune, în interiorul capacului, sub formă de picături, 0,1 ml H_2SO_4 N. În cutie, la margine, se introduc 2 ml soluție de carbonat de potasiu 50%. În cealaltă margine a cutiei se introduc 2 ml sînge heparinizat foarte proaspăt recoltat. Se așază cu grijă capacul pe cutie, astfel ca sîngele să nu se amestece cu soluția de carbonat de potasiu, iar picăturile de acid sulfuric să rămînă în poziția lor inițială. De jur împrejurul cutiei se așază o fâșie de leucoplast pentru a menține capacul etanș pe cutie.

Se aşază cutia pe platanul unui agitator mecanic de eprubete cu 50—70 frecvenţe pe minut. Se menţine agitarea 20 de minute, în care timp amoniacul din sînge difuzează.



Condiţii de lucru:
1 ml. diluţie + 4 ml reactiv Drabkin
Se citeşte extincţia pe fotocolorimetrul JOBIN-YVON
Filtru S_{55} = cuva de 1 cm.
Martor = 1 ml. apă + 1 ml. reactiv Drabkin

Fig. 125. — Pierderi de sînge în pansament. Hemoglobină standard 10,5 g %.

După aceasta se deschide cutia cu grijă, se transvazează cantitativ acidul sulfuric de pe capac, cu 2 ml apă bidistilată, într-o eprubetă.

Martorul se face introducînd în cutie 2 ml soluţie de carbonat de potasiu 50%, iar în capac, 0,1 ml H_2SO_4 normal.

Probele de sînge şi martorul se fac în dublu.

În eprubeta care conţine sulfat de amoniu se introduce succesiv, din biuretă, 1 ml reactiv fenolic şi imediat 1 ml reactiv hipoclorit în mediul alcalin, agitînd energic conţinutul. Se lasă eprubeta 30 de minute la întuneric, apoi se adaugă 6 ml apă. Se agită prin răsturnare. Coloraţia albastră este stabilă 24 de ore. Se colorimetrează cu Pulfrich IOR filtru S_{61} în cuva de 2 cm.

După ce se scade martorul din valoarea probei, rezultatul se extrapolează pe curba etalon, care se construieşte astfel: la 2 ml soluţie carbonat de potasiu 50% se adaugă 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 şi 0,05 ml din soluţia de sulfat de amoniu diluată. Se face difuzia în condiţiile de mai sus. Aceste concentraţii corespund la 28, 40, 60, 80 şi 100γ NH_3 la 100 ml sînge.

Valori normale: 40—60γ % NH_3.

Observaţii

Cînd se face un reactiv nou, se face un martor, valoarea lui nu trebuie să depăşească 35 unităţi extincţie.

Pentru evitarea formării amoniacului în sînge după recoltare, aceasta se face într-o eprubetă răcită, iar proba se transportă la laborator în gheaţă.

Determinarea trebuie făcută cît mai repede; pînă atunci proba de sînge se menţine la temperatura 0—4°.

Dozarea clorurilor

Clorul se poate doza în ser, în plasmă şi în globule. În cazul dozării clorului în plasmă şi globule, sîngele trebuie colectat pe un anticoagulant nesalin, cum este heparina. Se centrifughează foarte bine. Se separă plasma de globulele roşii şi se face determinarea, atît în plasmă, cît şi în globule, după tehnicile de mai jos.

1. **Metoda Laudat** constă în precipitarea clorului cu soluție de azotat de argint în prezența acidului azotic, dozînd apoi excesul de azotat de argint cu sulfocianură de potasiu. Sfîrșitul reacției este indicat de culoarea roz-persistentă dată de o sare ferică (alaunul feric). Pentru a mineraliza clorul legat de substanța organică, este necesară o distrugere prealabilă a materilor organice, care se face la cald, cu soluție saturată de permanganat de potasiu și acid azotic.

Reactivi : 1. Soluție $AgNO_3$ N/50.

2. Soluție N/50 KSCN ;

3. Soluție saturată $KMnO_4$ pur ;

4. Acid nitric D = 1,40 ;

5. Alaun de fier (sulfat dublu de fier și amoniu) 5%.

Tehnica. Într-un vas de 50 ml se pun 1 ml ser + 10 ml soluție NO_3Ag N/50 + 3 ml soluție saturată de MnO_4K + 1 ml acid nitric D = 1,40.

Se încălzește pînă se obține un lichid limpede, depunîndu-se precipitatul de clorură de argint. Se prelungește fierberea încă cîteva minute, pentru a obține eliberarea deplină a clorului organic, și se răcește amestecul. Excesul de azotat de argint se titrează cu soluția de sulfocianură de potasiu, în prezența a 0,5 ml soluție de alaun de fier, pînă la culoarea roz persistentă.

Calcul : 1 ml $AgNO_3$ N/50 corespunde la 1,17 mg NaCl sau la 0,71 mg Cl.

g Cl$^{0}/_{00}$ = N × 0,71
g NaCl$^{0}/_{00}$ = N × 1,71
N = 10 — n

n = numărul de ml de KSCN întrebuințați la titrare.

2. **Metoda spectrofotometrică** se bazează pe precipitarea clorurilor cu iodura de argint și determinarea iodului liber prin reacția de culoare.

Reactivi : 1. Acid fosfotungstic. Într-un balon cotat de 1 000 ml se dizolvă 50 g wolframat de sodiu în 800 ml apă. După dizolvare se adaugă 25,5 ml acid fosforic concentrat D = 1,71 și apoi se completează cu apă distilată pînă la semn.

2. Clorură de sodiu, soluție standard. În 3 baloane cotate de 1 000 ml se dizolvă 4,68, 5,84 și 7,02 g clorură de sodiu p.a. Se completează la semn cu apă bidistilată. Aceste soluții de comparație corespund la 80 — 100 — 120 mEq clorură de sodiu la 1 000 ml.

3. Iodat de argint.

4. Iodură de sodiu 2,5 mg%.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 4 ml soluție de acid fosfotungstic și 0,25 ml ser sau plasmă perfect clară, fără hemoliză. În alte 3 eprubete de centrifugă se măsoară în fiecare 4 ml soluție de acid fosfotungstic și cîte 0,25 ml din cele trei soluții de clorură de sodiu cu 80 — 100 și 120 mEq$^{0}/_{00}$. În fiecare din cele 4 eprubete se adaugă cîte 0,1 g iodat de argint. Se agită și după 2 — 3 minute eprubetele sînt centrifugate. Din supernatant se măsoară 0,25 ml din fiecare eprubetă, la care se adaugă 10 ml soluție iodură de sodiu 2,5 mg%. Proba albă conține numai soluție de iodură de sodiu 2,5 mg%.

Spectrofotometrul se reglează la 0 cu proba albă, iar după 5 minute se citește absorbția la 480 mμ.

Valorile de absorbție citite pentru soluțiile standard sînt notate pe o hîrtie milimetrică în funcție de concentrație. În funcție de această curbă etalon se determină conținutul de cloruri din proba de cercetat. Rezultatul este dat în mEq clorură de sodiu $^{0}/_{00}$.

Metoda poate fi aplicată și la dozarea clorurilor în urină. Se lucrează în același fel ca la ser, pe 0,25 ml urină filtrată.

3. **Metoda Schales.** Constă în titrarea clorurilor cu soluție de azotat de mercur în prezența difenilcarbazonei. În această reacție, ionii de Cl se combină cu ionii de Hg^{++} pentru a da clorura mercurică care este foarte puțin ionizabilă. Cînd tot clorul este transformat în clorură mercurică, excesul de nitrat de mercur dă cu difenilcarbazona (indicator) o colorație violetă, care indică sfîrșitul reacției.

Reactivi : 1. Azotat de mercur 3$^{0}/_{00}$: 3 g de azotat de mercur sînt dizolvate în 40 ml acid azotic N, apoi se completează la 1 000 ml cu apă distilată.

2. Acid azotic N : 75 ml acid azotic D = 1,40 sînt diluați la 1 000 ml cu apă distilată.

3. Clorură de sodiu p.a. 0,58 g$^{0}/_{00}$ în apă distilată.

4. Difenilcarbazona 0,1 g$^{0}/_{0}$ în alcool 95°. Reactivul se păstrează la întuneric.

5. Tungstat de sodiu 10%.

6. Acid sulfuric 2/3 N.

Tehnica. Într-un tub de centrifugă se măsoară:

— apă distilată 7 ml
— plasmă 1 ml
— tungstat de sodiu 1% 1 ml
— acid sulfuric 2/3 N 1 ml

Se agită amestecul şi după 5 minute de repaus se centrifughează. Din supernatant se iau 2 ml, la care se adaugă 2 picături de difenilcarbazonă 0,1%. Se titrează cu soluţia de azotat de mercur pînă la apariţia unei tente violet-mov, care indică sfîrşitul reacţiei.

Paralel cu proba de cercetat se prepară şi o probă martor, în care supernatantul este înlocuit cu soluţia etalon de clorură de sodiu 0,58$^0/_{00}$.

Calcul. Pentru 2 ml soluţie de clorură de sodiu 0,58 g$^0/_{00}$ s-a întrebuinţat la titrare 1,14 ml azotat de mercur.

Pentru proba de determinat s-a întrebuinţat 1,20 ml azotat de mercur:

$$\text{mEq Cl}^0/_{00}\text{ ml plasmă} = \frac{100 \times 1,20}{1,14} = 105$$

Pentru a obţine g Cl$^0/_{00}$ se înmulţeşte cifra 105 cu 0,035 5.

Pentru a obţine g ClNa$^0/_{00}$ se înmulţeşte cifra 105 cu 0,058 5.

Cu metoda Scheles se pot doza şi clorurile din urină şi lichidul cefalorahidian. În aceste cazuri, urina şi lichidul cefalorahidian sînt diluate 1/10. Dozarea se face pe 2 ml de diluat.

Valori normale

Plasmă = 96—106 mEq
L.C.R. = 125—135 mEq
Urină = 170—250 mEq

Valori normale

Ser = 3,6—3,8 g Cl$^0/_{00}$
Globule = 1,8—2 g Cl$^0/_{00}$

Raportul clor globular/Clor plasmatic = = 0,50—0,54.

Convertirea mEq în g$^0/_{00}$ pentru Cl

mEq	g$^0/_{00}$	mEq	g$^0/_{00}$
75	2,66	87	3,37
76	2,70	88	3,41
77	2,73	89	3,44
78	2,76	90	3,48
79	2,80	91	3,51
80	2,84	92	3,55
81	2,87	93	3,58
82	2,91	94	3,62
83	2,94	95	3,66
84	2,98	96	3,70
85	3,01	97	3,73
86	3,05	98	3,76
99	3,09	107	3,80
100	3,12	108	3,83
101	3,16	109	3,87
102	3,19	110	3,90
103	3,23	111	3,94
104	3,27	112	3,98
105	3,30	113	4,04
106	3,33		

Valorile scăzute sînt semnalate în uremie, acidoze, boli infecţioase, insuficienţă suprarenală etc. O scădere bruscă a cantităţii de clor poate duce la o stare gravă, mergînd pînă la comă sau sfîrşit letal. Cauzele cloropeniei sînt vărsăturile rebele şi abundente datorite stenozei pilorului, diareele etc. O dietă fără sare nu provoacă o hipocloremie.

Valori crescute sînt întîlnite în anemii, nefrite, decompensări cardiace, retenţie de urină, diabet insipid etc.

Dozarea fosforului

Cu metoda Briggs se poate doza fosforul total şi fosforul mineral.

Metoda Briggs pentru dozarea fosforului total. Principiul: ionul PO_4 dă cu molibdatul de amoniu în soluţie acidă fosfomolibdatul de amoniu care prin reducere cu hidrochinonă dă o coloraţie albastră, proporţională cu cantitatea de fosfor din proba de cercetat.

Reactivi: 1. Molibdat acid: 50 g molibdat de amoniu sînt dizolvate în 600 ml apă distilată, apoi se adaugă 300 ml acid sulfuric diluat 1/1 cu apă distilată. După ce se răceşte acidul diluat se trece în balonul cu molibdat şi se completează cu apă distilată la 1 000 ml. Molibdat neutru: 50 g molibdat de amoniu în $^0/_{00}$ ml apă.

2. Soluţie de hidrochinonă. 0,50 g hidrochinonă sînt dizolvate în 100 ml apă. Soluţia se conservă prin adăugarea unei picături de acid sulfuric.

3. Sulfit de sodiu (anhidru) 20 g în 100 ml apă.

4. Acid tricloracetic 20 g în 100 ml apă.

5. Acid sulfuric concentrat 1 ml + 2—3 picături perhidrol.

6. Soluţie standard 0,1 mg P/ml (pentru aceasta se dizolvă 0,439 g PO_4KH_2 în 1 000 ml apă).

Tehnica. Distrugerea substanţei organice se face în balon Kjeldahl. La 0,5 ml ser se adaugă 1 ml amestec oxidant. Se încălzeşte pînă la decolorare, cu grijă, ca să nu sară substanța, apoi se fierbe pe flacără încă 1/2 oră. Fosforul mineralizat se transvazează din balonul Kjeldahl în eprubete gradate, spălînd balonul de trei ori cu apă, pentru a nu avea pierderi; volumul final se completează la 10 ml. Peste acest volum de 10 ml se adaugă 2 ml molibdat neutru, 1 ml sulfit și 1 ml hidrochinonă. Paralel cu proba se face un martor din soluția standard cu concentrație de 0,02 mg P. La martori se întrebuințează molibdat acid.

După 20 de minute se compară intensitatea culorilor la colorimetru sau se citește extincția la fotocolorimetru. Citirile la fotocolorimetru se fac cu filtru roșu S_{61} și cuva de 1 cm. Apoi valorile extincțiilor citite sînt raportate la curba etalon. Pentru citirile efectuate la colorimetru se aplică formula:

$$\text{mg P \% ml ser} = \frac{\text{înălțimea soluției etalon}}{\text{înălțimea soluției de cercetat}} \times 0{,}02 \times 100$$

Valori normale = 7—15 mg P total % ml ser.

Metoda Briggs pentru dozarea fosforului mineral.

Reactivi: Aceiași ca la dozarea fosforului total.

Tehnica: Într-o eprubetă se pun 2 ml ser +6 ml apă+2 ml acid tricloracetic. Amestecul este bine agitat și lăsat în repaus timp de 10 minute. Se centrifughează apoi la 3 000 de turații timp de 30 de minute sau se filtrează. Din supernatant se iau 5 ml, la care se adaugă 2 ml molibdat de amoniu + 1 ml sulfit + 1 ml hidrochinonă + 1 ml apă. Paralel se lucrează o probă în alb. După 30 de minute se citește extincția la fotoclorimetru Pulfurich cu filtru S_{61} cuva 1 cm. Extincțiile sînt raportate apoi la curba de etalonare.

Valori normale = 2—4 mg P anorganic %ml ser.

Curba de etalonare pentru fosfor. A. Soluția stoc de fosfor cu 0,080 mg P/ml se conservă în prezența a 2—3 picături de cloroform timp îndelungat la +4°. Prepararea soluției:

— Fosfat monopotasic PO_4H_2K	0,351 4 g
— Apă distilată	1 000 ml

B. Soluția diluată de fosfor cu 0,008 mg P/ml se prepară în momentul intrebuințării din 5 ml soluție stoc + 45 ml acid tricloracetic 5%

În 5 tuburi cu capacitate de 15 ml se fac 5 diluții din soluția B, care conține 0,008 mg P/ml. Tubul 6 este proba în alb.

Nr. tub	sol. B (ml)	Acid tricloracetic (ml)	mg P%	Extincție
1	1	4	0,8	0,11
2	2	3	1,6	0,22
3	3	2	2,4	0,33
4	4	1	3,2	0,44
5	5	0	4	0,55
6	0	5	0	0,01

Fiecare diluție adusă la 5 ml amestec soluția B + acid tricloracetic este tratată cu 2 ml molibdat de amoniu, 1 ml sulfat de sodiu, 1 ml hidrochinonă și 1 ml apă.

După 30 de minute se citesc extincțiile diluțiilor la fotocolorimetrul filtru S_{61}, cuva de 1 cm.

Metoda Taussky și Shorr. Fosforul cu molibdatul de amoniu formează un complex fosfomolibdenic, care în prezența sulfatului de fier dă o colorație albastră, a cărei intensitate este proporțională cu cantitatea de fosfor.

Reactivi: 1. Acid tricloracetic 20%.

2. Acid sulfuric 10 N.

3. Molibdat de amoniu soluție acidă. 50 g molibdat de amoniu sînt dizolvate în 500 ml acid solfuric 10 N.

4. Soluția de sulfat de fier-molibdat de amoniu se prepară în momentul întrebuințării, din 5 ml soluție de molibdat de amoniu (3), 2,5 g sulfat de fier ($SO_4Fe \cdot 7\,H_2O$) și apă distilată pînă la 50 ml.

5. Soluția stoc de fosfor 1 g ‰. 1,155 g $PO_4HNa_2 \cdot 12H_2O$ sînt dizolvate în 100 ml apă distilată. Soluția se păstrează la +4°. Din soluția stoc se prepară două soluții cu concentrația de 20 mg și 50 mg %:

a) soluția 20 mg ‰. Din soluția stoc se măsoară 2 ml, care sînt aduși la 100 ml cu apă distilată;

b) soluția 50 mg‰. Din soluția stoc se măsoară 5 ml, care sînt aduși la 100 ml cu apă distilată.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 0,5 ml ser, 1,5 ml apă distilată și 2 ml acid tricloracetic, se agită, iar după 10 minute se centrifughează. Din supernatant se iau 3 ml, pe care se face determinarea fosforului anorganic.

O dată cu proba de determinat se lucrează și cele două soluții etalon în felul următor:

— Apă distilată (ml)	2	1,5	1,5
— Soluție de fosfor 20 mg‰ (ml)	—	0,5	—
— Soluție de fosfor 50 mg‰ (ml)	—	—	0,5
— Acid tricloracetic 20% (ml)	2	2	2

Din fiecare tub se iau 3 ml pentru determinarea fosforului anorganic. În proba de determinat, în cele două probe etalon şi proba albă se adaugă 2 ml reactiv sulfat de Fe_2 — molibdat de amoniu. Se agită, iar după 5 minute se citeşte extincţia la fotocolorimetru cu filtru roşu S_{61}, cuva 1 cm. Culoarea este stabilă o oră.

Metoda poate fi aplicată la dozarea fosforului urinar. În acest caz, urina trebuie diluată 1/25 sau 1/50. La calcul se ţine seama de diluţia efectuată.

Dozarea calciului total

Metoda Wood. Calciul este precipitat sub formă de oxalat de calciu, direct din ser, fără dezalbuminare prealabilă. Precipitatul este solubil în acid azotic concentrat D = 1,4, eliberîndu-se acidul oxalic, care se titrează cu soluţie de permanganat de potasiu.

Reactivi : 1. Soluţia saturată de oxalat de amoniu (4 g%).

2. Soluţie de permanganat de potasiu N/100.

3. Acid azotic concentrat.

Tehnica. Se pun 2 ml ser într-un tub de centrifugă, se adaugă 2 ml apă, plus 1 ml soluţie saturată de oxalat de amoniu. După minimum 2 ore se centrifughează timp de 10 minute, iar lichidul se înlătură prin absorbţie cu un tub efilat pus în legătură cu trompa de apă. Precipitatul de oxalat de calciu este spălat de trei ori cu o soluţie de amoniac 2%. Peste precipitatul astfel spălat se adaugă 0,5 ml acid azotic concentrat D = 1,4 sau 2 ml acid sulfuric N, se încălzeşte la o baie de apă la 70—75° şi se titrează la cald cu o soluţie de permanganat de potasiu N/100 pînă la culoarea roz.

Paralel cu proba de dozat se face şi o probă în alb, în care serul este înlocuit cu 2 ml apă distilată.

Calcul. 1 ml soluţie de permanganat de potasiu N/100 corespunde la 0,2 mg calciu. Ca %ml ser = N × 0,2 × 50, în care :

mg $N = n_1 - n_2$.

n_1 = numărul de ml întrebuinţaţi la titrarea probei ; n_2 = numărul de ml de permanganat întrebuinţat la titrarea probei în alb.

Metoda Elliot constă în titrarea directă a ionilor de calciu în mediul alcalin cu sarea de sodiu a acidului etilendiamintetraacetic (EDTA) în prezenţa murexidului utilizat ca indicator.

Reactivi :

1. EDTA N/100. 1,86 g EDTA sînt dizolvate în 1 000 ml apă bidistilată.

2. Soluţie NaOH 9 N (36 g %)

3. Purpurat de amoniu (murexid) 1%.

4. Soluţie stoc de calciu. 2 g CO_3Ca sînt tratate pînă la dizolvare cu acid clorhidric N şi apoi se aduce la semn cu apă distilată în balon cotat de 1 000 ml. 1 ml din această soluţie conţine 0,8 mg calciu. Soluţia stoc diluată 1/10 conţine 0,08 mg calciu. 5 ml din soluţia stoc diluată conţin 0,40 mg Ca şi trebuie să titreze exact 2 ml soluţie EDTA. 1 ml EDTA = 0,20 mg Ca.

Tehnica. 2 ml ser sînt diluaţi cu 50 ml H_2O bidistilată în balon de 250 ml. Se adaugă 0,4 ml NaOH 9N şi o picătură de indicator. Apoi se titrează cu EDTA N/100 pînă la virajul violet.

Paralel se titrează şi o probă în alb, folosind apa în loc de ser.

Calcul : calciu mg% = N × 50 × 0,2 mg.

$N = n_1 - n_2$

n_1 = ml EDTA folosită la titrarea probei.

n_2 = ml EDTA folosită la titrarea probei în alb.

Valori normale : 9 — 11 mg% ml ser.

Valori crescute se întîlnesc în hipervitaminoza D, scleroze, hiperparatiroidism, gută, reumatism în unele boli osoase cu demineralizare.

Valori scăzute se întîlnesc în carenţa de vitamină D, în rahitism în stadiul de alcaloză.

Calciul seric se compune din două fracţiuni fiziologice distincte : calciul dializabil sau calciul ionic şi calciul nedializabil legat de proteinele serice.

Calciul ionic este dializat în sac de celofan faţă de apa distilată timp de 24 de ore. Pe dializat se determină calciul cu metodele descrise. Cantitatea de calciu neionizabilă scăzută din cantitatea de calciu totală reprezintă cantitatea de calciu ionic.

mg calciu ionic = mg calciu total — mg calciu neionizabil.

Calciul ionic poate fi determinat din tabelul de mai jos şi fig. 126. Tabelul conţine cantitatea de calciu total şi proteine totale%. Ambele componente sînt determinate prin metodele descrise în text.

Calciu total	Proteine totale			
mg%	6g%	7g%	8g%	9g%
6	2,7	2,5	2,3	2,1
7	3,2	3	2,7	2,5
8	3,8	3,4	3,2	2,9
9	4,3	3,9	3,6	3,3
10	4,8	4,4	4	3,7
11	5,4	4,9	4,5	4,2
12	5,9	5,4	4,9	4,6

Fracţiunea dializabilă constituie cam 45 — 55% din calciu şi este crescută în hiperparatiroidism, procese distructive în ţesutul osos şi hipervitaminoză D. Ea este dimpotrivă scăzută în tetania sugarilor şi uneori în rahitism.

3. Amoniac 20%.
4. Amoniac 2%.
5. Acid sulfuric N.
6. Molibdat de amoniu 2,5% în acid sulfuric N/10.

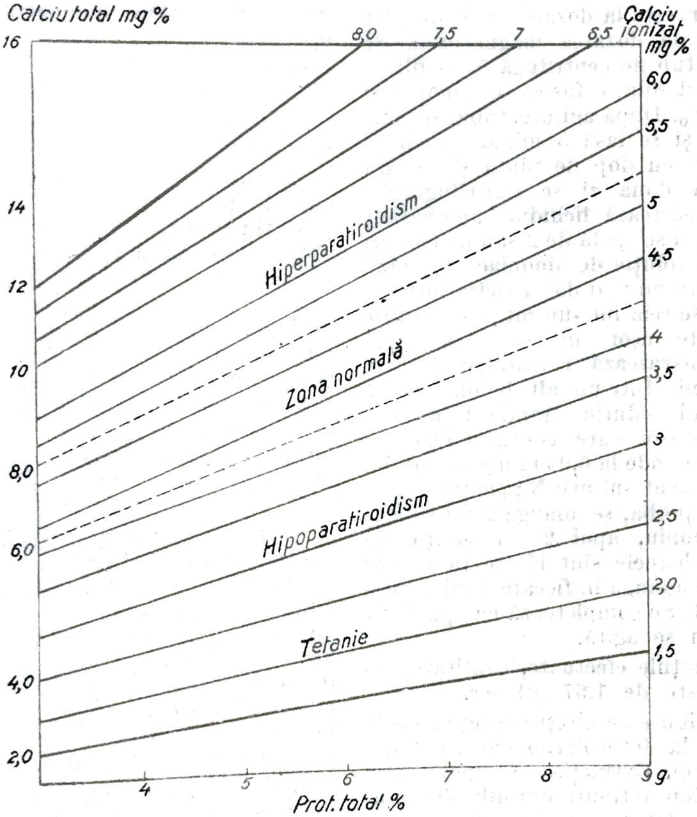


Fig. 126.— Explicaţii în text.

Dozarea magneziului

Metoda colorimetrică. Metoda se bazează pe îndepărtarea calciului prin precipitare cu oxalat, după care urmează precipitarea magneziului ca fosfat amoniaco-magnezian; din acesta se determină apoi fosforul prin metoda colorimetrică şi se calculează magneziul corespunzător.

Reactivi : 1. Oxalat de amoniu soluţie saturată.

2. Fosfat de amoniu 2%.

7. Acid sulfuric N/10.

8. Hidrochinonă 2%. Hidrochinona se dizolvă în 100 ml apă distilată, la care se mai adaugă 0,1 ml acid sulfuric. Reactivul se păstrează la întuneric în sticle colorate şi bine închise.

9. Soluţia standard de fosfor 1 g‰. 4,4 g fosfat monopotasic sînt dizolvate în 1 000 ml apă. Se adaugă pentru conservare 3 ml cloroform.

10. Soluţia de carbonat-sulfit. 7,5 g sulfit de sodiu cristalizat cu $7\ H_2O$ se dizolvă în 50 ml apă distilată. Se adaugă 200 ml dintr-o soluţie

20% de carbonat de sodiu cristalizat cu 10 H_2O.

Tehnica. Proba de cercetat se lucrează pe 2 ml ser, la care se adaugă 3 ml apă distilată + 1 ml oxalat de amoniu. Se agită şi se lasă în repaus minimum 6 ore. Se centrifughează, şi precipitatul serveşte la dozarea calciului, iar filtratul serveşte la dozarea magneziului. Se măsoară într-un tub de centrifugă 5 ml filtrat şi se adaugă 1 ml soluţie fosfat de amoniu şi 2 ml amoniac 20%. După agitare, tubul se pune pe baia de apă şi se lasă 5 minute, apoi se scoate, se astupă cu dop de plută şi se lasă peste noapte. A doua zi se centrifughează puternic, se îndepărtează lichidul supernatant la trompa de vid şi se spală de 2 sau de trei ori precipitatul cu o soluţie de amoniac 2%, pînă ce apele de spălare nu mai dau reacţia fosforului. Precipitatul se reia într-un ml acid sulfuric N. Se încălzeşte uşor în baia de apă, soluţia se transvazează cantitativ într-un balonaş de 25 ml. Într-un alt balon de 25 ml se pun 5 ml soluţie standard diluată de fosfat de potasiu care conţine 0,05 mg fosfor şi deci corespunde la 0,039 2 mg magneziu. Se adaugă 1 ml acid sulfuric N; pentru a fi în condiţii egale cu proba, se adaugă 2 ml soluţie molibdat de amoniu, apoi 2 ml soluţie de hidrochinonă. Baloanele sînt lăsate în repaus 5 minute, apoi se adaugă în fiecare 1 ml soluţie de sulfit-carbonat. Se completează cu apă distilată la 25 ml şi se agită.

După toate diluţiile efectuate, cantitatea de ser din probă este de 1,67 ml ser.

După 30 de minute se citeşte reacţia, fie la colorimetru, fie la fotocolorimetru cu filtru S_{61}, cuva de 1 cm. Extincţia este apoi raportată la curba etalon obţinută din diluţiile soluţiei standard de fosfat de potasiu cu 0,05 mg P.

Micrometoda Veluz. După mineralizarea serului se precipită magneziul cu ortooxichinoleină sub formă de oxichinoleinat de magneziu insolubil, care se bromurează cu un exces de bromură şi care pune în libertate brom.

Excesul de brom tratat cu iodură de potasiu pune în libertate iod, care se titrează cu tiosulfat de sodiu.

Reactivi: 1. Acid clorhidric 5%.
2. Acid acetic glacial 0,5%.
3. Oxalat de amoniu N/10.
4. Amoniac 10%.
5. Ortooxichinoleină 2% în alcool 95°.
6. Acid clorhidric 10%.
7. Bromură de potasiu 40%.
8. Bromură-bromat de potasiu N/10. Se cîntăresc exact 50 g bromură de potasiu şi 2,785 g bromat de potasiu. Se trec într-un balon cotat de 1 000 ml, se dizolvă în apă distilată şi se completează la semn, în momentul întrebuinţării: în momentul întrebuinţării se diluează 1/5.
9. Iodură de potasiu 20%.
10. Amidon 1%.
11. Tiosulfatul de sodiu N/50. Se prepară în momentul întrebuinţării din tiosulfat N/10.

Tehnica. 1. *Mineralizarea serului.* Într-o capsulă de platină se iau 5 ml ser nehemolizat şi se ţin la 105–110° cca. 4 – 5 ore, pînă se obţine un reziduu uscat. Apoi se calcinează cu precauţie pe un bec Bunsen, la început cu flacără mică, şi din ce în ce mai mare, pînă se obţine o cenuşă albă. Se lasă să se răcească, apoi se adaugă 2 ml acid clorhidric 5% (1) şi se evaporă la sec pe baie de nisip sub nişă sau în etuvă. Se dizolvă reziduul în 5 ml acid acetic 0,5% (2) şi se trece într-un balon Erlenmeyer de 50 ml cu dop rodat, spălînd capsula de 5 ori cu cîte 1 ml apă distilată şi adăugînd apele de spălare în acelaşi vas.

2. *Precipitarea magneziului.* Se adaugă apoi agitînd uşor: 2 ml oxalat de amoniu N/10 (3) 2 ml amoniac 10% (4) şi 0,25 ml ortooxichinoleină 2% (5). Se astupă balonul Erlenmeyer cu dop şi se introduce 10 minute într-o baie de apă la fierbere, apoi se filtrează printr-o placă de sticlă Jena. Se spală paharul de 4 ori cu cîte 5 ml amoniac 10% (4), adăugînd şi apele de spălare pe filtru. La sfîrşit se spală pereţii acestuia cu încă 5 ml amoniac 10%.

3. *Titrarea.* Se trece filtrul de sticlă într-o eprubetă tip Hagedorn şi se dizolvă oxichinoleinatul de magneziu adăugînd pe filtru încet 3 ml acid clorhidric 10% (6), apoi încă o porţiune de 5 ml, cu care se spală pereţii filtrului. În eprubetă se adaugă 5 ml bromură de potasiu 40% (7) şi 5 ml soluţie de bromură-bromat de potasiu N/50 (8). Se agită uşor, apoi se adaugă 5 ml iodură de potasiu 20% (9) şi 2 picături de amidon 1% (10). Se titrează iodul pus în libertate cu tiosulfat de sodiu N/50 (11) pînă la dispariţia culorii albastre.

În altă eprubetă Hagedorn se face un martor luînd 5 ml soluţie bromură-bromat de potasiu N/50 şi adăugînd 5 ml iodură de potasiu 20% şi 2 picături de amidon 1%, care se titrează ca şi proba de analizat.

Calcul: 1 ml tiosulfat de sodiu N/50 corespunde la 0,061 mg magneziu.

mg Mg % ml = N × 0,061 × 20.

$N = n_1 - n_2$.

n_1 = ml tiosulfat N/50 întrebuinţaţi la titrarea probei martor.

n_2 = ml tiosulfat N/50 întrebuinţaţi la titrarea probei de analizat.

Valori normale. Serul normal conţine 2,2 — 3 mg magneziu/100 ml, iar eritrocitele conţin cca. 5 mg/100 ml. Magneziul are o acţiune fiziologică antagonistă cu calciul într-o serie de fenomene. El are, de asemenea, rolul important de activator al unor enzime (fosfataze) şi inhibitor al altora.

Avitaminoza D se însoţeşte de o creştere cu 50% a conţinutului serului în magneziu.

Dozarea potasiului

Metoda Kramer constă în precipitarea potasiului cu cobaltnitrit de sodiu sub formă de cobaltnitrit de potasiu şi sodiu care, cu ferocianura de sodiu, dă o coloraţie verde, proporţională cu cantitatea de potasiu prezentă în proba de analizat.

Reactivi: 1. Reactivul Kramer.

Soluţia A. 6 g azotat de cobalt $Co(NO_2)$ se dizolvă în 10 ml apă distilată. După dizolvare se adaugă 2,5 ml acid acetic glacial.

Soluţia B. 24 g azotat de sodiu se dizolvă în 36 ml apă distilată.

La întreaga cantitate de soluţie A se adaugă 42 ml soluţie B. Se trece un curent de aer prin soluţie pentru degajarea vaporilor nitroşi. Reactivul se poate conserva în sticlă de culoare închisă la frigider cel mult 2 săptămîni.

2. Alcool 70%.
3. Ferocianură de potasiu 2%.
4. Clorhidrat de colină 1%.
5. Soluţie standard 0,2 mg potasiu/ml. Se dizolvă 0,228 g sulfat de potasiu în 500 ml apă distilată.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 0,5 ml ser nehemolizat, plus 1 ml reactiv Kramer. Se lasă amestecul timp de 45 de minute în repaus şi apoi se centrifughează 15 minute. Se decantează prin sifonare supernatantul, iar precipitatul se spală cu 2 ml apă, se centrifughează 5 minute, se îndepărtează lichidul supernatant, iar precipitatul se spală cu 5 ml alcool 70%. Din nou se centrifughează 5 minute, se decantează, iar precipitatului i se adaugă 1 ml apă. Se fierbe pînă se albeşte precipitatul, se răceşte şi se adaugă 0,5 ml clorhidrat de colină + 0,5 ml ferocianură de potasiu + 2 ml apă.

Paralel cu probele de cercetat se face un martor înlocuind serul cu apă.

Citirea extincţiei se face la fotocolorimetru Pulfrich cu filtru S_{63} cuva 1 cm. Extincţiile sînt raportate pe curba construită cu diluţiile obţinute din soluţia standard de 0,2 mg K/ml.

Citirea intensităţii de culoare se face la colorimetru faţă de o soluţie cunoscută de sulfat de potasiu în concentraţie de 1 ml = 0,2 mg potasiu.

Metoda complexometrică constă în precipitarea potasiului cu cobaltnitrit de sodiu sub formă de colbaltnitrit de potasiu şi sodiu, care cu EDTA dă o coloraţie proporţională cu cantitatea de potasiu prezentă în probă.

Reactivi: 1. Sulfat de potasiu p.a. 0,456 g%.
2. EDTA (etilendiamintetraacetic) 5%.
3. Alcool 70%.
4. Apă oxigenată 3%.
5. Reactivul Kramer. Soluţia A. 5 g azotat de cobalt sînt dizolvate în 10 ml apă distilată, la care se adaugă 2,5 ml acid acetic glacial. Soluţia B. 24 g nitrit de sodiu sînt dizolvate în 36 ml apă distilată. Se amestecă 42 ml soluţie B cu întreaga cantitate de soluţie A.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 0,5 ml ser nehemolizat plus 1,5 ml reactiv Kramer. Amestecul este lăsat 2 — 3 ore. Se adaugă 3 ml apă, se agită şi se centrifughează 10 minute. Supernatantul este îndepărtat prin sifonare, iar precipitatul este tratat cu 3 ml apă. Se agită şi se centrifughează din nou 10 minute. Precipitatul este reluat în 5 ml alcool 70°; se agită, se centrifughează şi se decantează. Precipitatul este tratat cu 1 ml EDTA 5%, plus 4 ml apă oxigenată 3%. Se agită şi amestecul se ţine la cald pînă la dizolvarea completă a precipitatului. Citirea extincţiei se face la fotocolorimetru Pulfrich cu filtru S_{57}, cuva 1 cm.

mg K % ml ser = $E \times T$

E = extincţia.

T = factorul de pantă.

Factorul de pantă pentru această metodă este egal cu 260.

Valori normale în ser 16 — 22 mg K % ml ser.

Valori normale în sînge 170 mg %.

Valorile crescute sînt semnalate în ulceraţii ale stomacului sau duodenului, ciroze hepatice diabet, artrite cronice, pleurite, insuficienţă cardiacă, şoc anafilactic, poliglobulie, tetanie etc.

Valorile scăzute sînt semnalate în tumori maligne, menstruaţie, icter de ocluzie, boli infecţioase etc.

Metoda Weinbach. Se precipită sodiul în mediul alcoolic ca sare triplă de acetat de uranil, zinc şi sodiu care, se titrează cu hidroxid de sodiu în prezenţa fenolftaleinei.

Reactivi : 1. Acetat de zinc şi uranil. Soluţia A : la 77 g acetat de uranil se adaugă 14 ml acid acetic glacial, se dizolvă în puţină apă, se fierb 5 — 10 minute şi se amestecă bine, apoi se completează cu apă bidistilată la volum de 500 ml. Soluţia B : la 23,1 g acetat de zinc se adaugă 7 ml acid acetic glacial şi se dizolvă în puţină apă încălzită la fierbere, se agită bine, apoi se completează pînă la 500 ml cu apă bidistilată.

Soluţiile A şi B se amestecă cît sînt calde. Reactivul este lăsat 24 de ore la temperatura laboratorului apoi este filtrat.

2. Acetona.

3. Soluţie standard de sodiu. 1 g de clorură de sodiu este dizolvat în 1 000 ml apă distilată. 1 ml din această soluţie conţine 0,393 mg sodiu.

4. Acid tricloracetic 20°.

5. NaOH N/50.

6. Fenolftaleină 1% în alcool 96°.

Tehnica. Se tratează 1 ml ser sau plasmă cu 3 ml apă bidistilată + 1 ml acid tricloracetic 20%. Amestecul se agită şi se lasă în repaus 10 minute, apoi se centrifughează şi se filtrează printr-un filtru fără cenuşă. Sodiul se determină pe 0,5 ml filtrat, ceea ce corespunde la 0,1 ml ser. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 0,5 ml filtrat şi se adaugă 5 ml reactiv acetat de uranil şi zinc şi 0,3 ml alcool, se lasă în repaus 5 minute şi operaţia se repetă pînă la adăugarea în total de 2,1 ml alcool, ceea ce durează 30 de minute. După 4 ore de repaus, se centrifughează, supernatantul se îndepărtează prin sifonare, iar precipitatul este spălat cu 10 ml acetonă. Se centrifughează din nou, se decantează lichidul. Tuburile cu precipitat sînt lăsate 24 de ore în exsicator pentru uscarea perfectă a precipitatului.

Precipitatul se dizolvă în 4—5 ml apă şi se trece într-un vas Erlenmeyer de 100 ml capacitate, se spală tubul cu un volum de 50 ml apă. Se adaugă apoi 0,5 ml fenolftaleină 1% şi se titrează cu NaOH N/50 pînă la culoarea roz-pal. Se face un martor în alb şi o probă cu o cantitate cunoscută de Na. Pentru titrare se întrebuinţează o microbiuretă gradată. Titrarea se face mai întîi la rece pînă la roz-persistent, apoi se încălzeşte la fierbere pînă la decolorare şi se retitrează cu NaOH pînă la roz-persistent.

Dacă se lucrează pe sînge, se diluează 1 volum sînge cu 9 volume apă , se lasă să se facă hemoliza completă, apoi se adaugă 2 ml acid tricloracetic 20% şi se agită. Se amestecă şi se filtrează printr-un filtru cantitativ fără cenuşă. Se determină sodiul pe 0,5 filtrat pentru ser sau plasmă şi pe 1 ml filtrat pentru sînge total.

Calcul : 1 ml NaOH N/50 corespunde la 0,0575 mg Na.

mg Na % ml ser = N × 0,0575 × 1 000

$N = n_1 - n_2$.

n_1 = numărul de ml de NaOH întrebuinţaţi la titrarea probei.

n_2 = numărul de ml de NaOH întrebuinţaţi la titrarea probei albe.

Metoda colorimetrică. Se precipită sodiu sub formă de acetat triplu de uranil magneziu şi sodiu, care se tratează cu o soluţie de ferocianură de potasiu în mediul acetic. Se formează un complex colorat a cărei intensitate este proporţională cu cantitatea de sodiu din probă.

Reactivi : 1. Acid tricloracetic 20%.

2. Alcool 95°.

3. Reactiv Kahane. Se dizolvă la cald 32 g acetat de uraniu + 100 g acetat de magneziu într-un amestec de 500 ml alcool 90° plus 300 ml apă distilată. Se răceşte, se adaugă 20 ml acid acetic glacial şi se completează la volum de 1 000 ml cu apă distilată. Se lasă soluţia 48 de ore în repaus. Se conservă la întuneric şi se filtrează înainte de întrebuinţare.

4. Soluţii titrate de acetat de uranil, magneziu şi sodiu. Se precipită 20 ml soluţie de ClNa 2,5% cu 500 ml reactiv Kahane. După 30 de minute de repaus se filtrează printr-o pîlnie Büchner, se spală precipitatul de 3 ori cu reactivul Kahane şi de 3 ori cu alcool 95°. Se usucă o oră la 105°. Se cîntăreşte exact 1 g precipitat uscat şi se dizolvă în 1 000 ml apă distilată.

1 ml din această soluţie conţine 0,015 mg sodiu.

5. Ferocianură de potasiu 1%, la care se adaugă după dizolvare 2 ml acid acetic glacial.

Soluția nu se conservă ; se prepară în momentul întrebuințării.

Tehnica. 2 ml ser nehemolizat + 2 ml acid tricloracetic 20% se agită și se centrifughează. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 1 ml supernatant + 7 ml reactiv Kahane. Se agită și se lasă în repaus 30 de minute la temperatura laboratorului sau 24 de ore la gheață. Se centrifughează apoi la mare viteză, iar precipitatul se spală de 2 ori cu cîte 5 ml reactiv Kahane și de 3 ori cu cîte 5 ml alcool. Precipitatul perfect spălat se dizolvă în apă și se trece în balon cotat de 100 ml. Se completează la semn cu apă bidistilată. Din această soluție se măsoară 5 ml, la care se adaugă 5 ml soluție de ferocianură de potasiu. Reacția se citește după 30 de minute la Pulfrich cu filtru S_{53} cuva de 1 cm, fiind martor apa distilată.

Extincția citită se raportează la curba etalon sau se calculează.

Valori normale : în ser, 280 — 350 mg Na% ml.
„ „ în sînge, 170 — 200 mg Na % ml.
„ „ în eritrocite, 40 — 130 mg Na % ml.

Valori crescute se întîlnesc cu regularitate în insuficiența renală și în bolile cardio-renale.

Valori scăzute se întîlnesc în stadiul final al nefritei, boala Addison, meningite, obstrucții intestinale.

Dozarea fierului

Metoda Heilmeyer-Ploetner. Sărurile feroase dau cu ortofenantrolina un complex roșu foarte stabil, format din 3 molecule de ortofenantrolină pentru un atom de fier feros. Intensitatea culorii este proporțională cu cantitatea de fier.

Reactivi : 1. Acid clorhidric 6 N. Se tratează un volum acid clorhidric D = 1,19 *pro analisi* cu un volum apă bidistilată.

2. Acid tricloracetic 20%.
3. Paranitrofenol 1% în alcool de 96°.
4. Amoniac p. a. 20%.
5. Acid sulfuric N/2.
6. Hidrochinonă 2%, reactiv care se prepară în ziua respectivă.

Se dizolvă 0,2 g hidrochinonă în 10 ml apă bidistilată.

7. Clorhidrat de ortofenantrolină 1% în apă bidistilată acidulată cu 2—3 picături de acid sulfuric p.a.

Soluția trebuie să rămînă incoloră.

Tehnica. Într-o eprubetă Jena se iau 2 ml ser nehemolizat și 1 ml acid clorhidric 6N. Se agită bine și se lasă în repaus 10 minute. Se adaugă apoi 2 ml acid tricloracetic 20%, se agită din nou, se lasă în repaus 10 minute, apoi se filtrează printr-un filtru mic lipsit de fier sau se centrifughează. Din filtratul clar sau din supernatant se iau 2,5 ml (1 ml ser) și se trec într-o eprubetă gradată de 10 ml, se adaugă o picătură de p-nitrofenol 1% (3) și se neutralizează cu amoniac 20% (4), pînă cînd lichidul capătă o culoare galbenă-slabă, apoi se adaugă picătură cu picătură acid sulfuric N/2 pînă la dispariția culorii galbene. Se adaugă 3 picături de hidrochinonă 2% și 3 picături de o-fenantrolină 1% și se agită ușor. Se aduce la volumul final de 10 ml cu apă bidistilată. Paralel cu aceste operații se face un martor în alb, luînd 2 ml apă bidistilată în loc de ser, care se tratează apoi ca și proba de analizat. După 10 minute se citește extincția la fotometru Pulfrich cu filtrul verde S_{53} și cuva de 20 mm, folosind ca lichid compensator apă bidistilată.

Calcul : Fier $\gamma/100\ \text{ml} = E_s - E_a \times K$
$E_s =$ extincția probei de analizat.
$E_a =$ extincția martorului în alb.
$K =$ factor de pantă cu valoarea de 31.

Eroarea dată de această metodă este de ±5% pentru o cantitate totală de fier de peste 1 γ /ml. Curba de etalonare se obține din soluții standard cu concentrații bine cunoscute. Soluția stoc = 0,0863 g alaun feriamoniacal p. a. $[FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O]$ dizolvat în 50 ml HCl 6N. Din această soluție se face o diluție 1% . 1 ml = 2γ fier. În 3 eprubete se pun cantitățile de 0,5, 1, 1,5, 2 și 3 ml din soluția 1 ml = 2γ fier. Aceste soluții servesc la construirea curbei etalon.

Cantitatea este aproape constantă la adulți, însă există o diferență caracteristică între cele 2 sexe. În mod normal, la bărbați se găsesc 130γ% ml ser, pe cînd la femei, 90 — 100γ% ml ser.

Dozarea iodului proteic

Metoda Sandell-Kolthoff. Iodul legat de proteine este trecut în iodură prin calcinare cu hidroxid de potasiu.

Reactivi : 1. Tampon acid acetic-acetat : 56 ml acid acetic glacial și 118 g acetat de sodiu se trec într-un balon cotat de 1 000 ml, se dizolvă şi se completează cu apă bidistilată la semn.

2. Sulfat de amoniu, soluţie saturată.

3. Hidroxid de potasiu, soluţie saturată.

4. Alcool etilic 95°. Se purifică prin distilare cu hidroxid de sodiu.

5. Acid sulfuric 7N. Îndepărtarea eventualelor urme de iod din acidul sulfuric se face prin încălzire la 150 — 200°, timp de 5 ore.

6. Sulfat de ceriu N/50. Se obţine prin dizolvarea cantităţii corespunzătoare de sulfat de ceriu şi amoniu sau sulfat ceric în acid sulfuric 1,6 N.

7. Acid arsenios N/10. Cantitatea corespunzătoare de acid arsenios se dizolvă într-o cantitate mică de soluţie de hidroxid de sodiu N şi se acidulează cu acid sulfuric, astfel că soluţia finală să fie de aproximativ N/100 în acid sulfuric.

8. Iodură de potasiu, soluţie-etalon. Se dizolvă 261,6 mg iodură de potasiu în 1 000 ml apă bidistilată : 1 ml conţine 400 µ g iod. Cu cel mult 48 de ore înainte de întrebuinţare se fac diluţiile necesare pentru a obţine o soluţie cu 0,08 µ g iod/ml.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se introduc 2 ml plasmă, 6 ml tampon acid acetic-acetat (1) şi 10 picături de soluţie saturată de sulfat de amoniu (2). Se introduce eprubeta 10 minute într-o baie de apă la fierbere, agitînd mereu, pentru a preveni precipitarea în flocoane mari, greu de spălat. Precipitatul este separat prin centrifugare şi spălat de trei ori cu cîte 6 ml apă bidistilată.

Precipitatului spălat i se adaugă 2 ml soluţie saturată de hidroxid de potasiu (3), se ţine eprubeta într-o baie de apă la fierbere, pînă la dizolvarea proteinelor şi se trece cantitativ cu apă bidistilată într-un creuzet de nichel, care este încălzit la o flacără mică pînă la încetarea spumegării.

Apoi creuzetul este introdus într-un cuptor încălzit 15 minute la 250°.

Final, temperatura se ridică încet la 380°, unde se menţine timp de 10 minute.

Masa topită în creuzet se dizolvă în foarte puţină apă şi după evaporare, la consistenţa unei paste, se tratează cu 5 ml alcool etilic, care este apoi decantat în alt creuzet de nichel. Operaţia se repetă de trei ori cu cîte 2 ml alcool. Se evaporă alcoolul şi se încălzeşte creuzetul timp de 15 minute la 500 — 550°.

Se dizolvă reziduul în apă bidistilată apoi se filtrează într-un balon cotat de 50 ml, spălînd de mai multe ori creuzetul şi filtrul. Înainte de colorimetrare se adaugă 2 ml acid sulfuric 7 N (5), se agită pînă la încetarea efervescenţei şi se aduce la semn. Determinarea extincţiei corespunzătoare timpului de înjumătăţire a ceriului se face punînd în una din cuvele fotometrului Pulfrich apă, iar în cealaltă o soluţie formată din 0,5 ml sulfat de ceriu N/50 (6) şi 23,5 ml apă. Se citeşte extincţia. Pentru determinarea timpului de înjumătăţire a probei se pun în cuvă : 20 ml soluţie din balonul cotat, 1 ml apă bidistilată, 2 ml acid arsenios N/10 (7) şi 1 ml sulfat de ceriu N/50 şi se măsoară timpul cu ajutorul unui cronometru, care se porneşte în momentul cînd s-a adăugat sulfatul ceric şi se opreşte în momentul cînd se observă egalitatea de tentă în cele 2 semicercuri, tamburul corespunzător cuvei cu proba fiind fixat la diviziunea corespunzătoare jumătăţii din cantitatea de ceriu pusă, diviziune stabilită în prealabil, aşa cum s-a arătat mai sus. Citirea se repetă exact cu alţi 20 ml din probă, la care s-a adăugat 1 ml soluţie-etalon de iod (0,08 µ g iod) (8) în loc de 1 ml apă bidistilată.

Calcul : Iod µg/100 ml $= 125 \times \frac{0{,}08 \times t_2}{t_1 - t_2}$ unde :

$t_1 =$ timpul în secunde necesar primei probe pentru a-şi reduce intensitatea de coloraţie la jumătate.

$t_2 =$ timpul în secunde necesar probei cu adaos de iod pentru a-şi reduce intensitatea de coloraţie la jumătate.

Valori normale. Iodul plasmatic variază în mod normal între 4 şi 8 µg/100 ml.

Dozarea cuprului

Metoda cu ditizonă. Serul tratat cu acid clorhidric diluat eliberează cuprul din combinaţia sa cu proteinele care sînt apoi precipitate cu acid tricloracetic. Cuprul se extrage cu ditizona (difeniltiocarbazona) sub formă de ditizonat de cupru de culoare violetă, care, fiind proporţională cu cantitatea de cupru, se măsoară la fotometru.

Reactivi :

1. Acid clorhidric concentrat.

2. Acid tricloracetic 20%.

3. Metiloranj 0,1%.

4. Acetat de sodiu 2 M. Această soluţie se purifică de orice urmă de cupru prin agitare în pîlnia de separare cu o soluţie de ditizonă 0,5% în

tetraclorură de carbon, pînă ce aceasta rămîne verde. Se separă soluția de ditizonă și, pentru că o parte din ea trece în soluție apoasă, se înlătură prin agitare repetată cu tetraclorură de carbon pură.

5. Soluție stoc ditizona 0,02%.

Ditizona se oxidează în contact cu aerul, dînd compuși de culoare brună, solubili în tetraclorură de carbon. Pentru purificare se trece ditizona în soluție apoasă în mediul alcalin, iar produșii de oxidare rămîn în solventul organic. Într-o pîlnie de separare de 50 ml se dizolvă 10 mg ditizonă pulverizată fin în 15 ml tetraclorură de carbon pură agitînd puternic. Se adaugă 20 ml amoniac 0,2 N și se agită. Faza amoniacală apoasă superioară se colorează în roșu-portocaliu, iar tetraclorura de carbon în verde-brun. Se separă faza de tetraclorură de carbon și se extrage din nou cu 10 ml amoniac, după care se colorează în galben-brun faza de tetraclorură separată și se îndepărtează. Cele 2 soluții amoniacale sînt reunite în pîlnia de separare și spălate de patru ori cu cîte 10 ml tetraclorură de carbon, apoi filtrate printr-un filtru spălat și acidulate cu acid clorhidric. Ditizona precipitată pe filtru se extrage cu 25 ml, apoi cu 10 ml tetraclorură de carbon și se spală în pîlnia de separare de trei ori cu cîte 20 ml apă bidistilată. La sfîrșit se completează volumul la 50 ml cu tetraclorură de carbon, se filtrează și se păstrează la întuneric la frigider. Soluția este stabilă cel mult 3 săptămîni. În momentul întrebuințării se diluează 1/3 cu teraclorură de carbon.

6. Tetraclorură de carbon.

7. Acid clorhidric N/100 conținînd 2% iodură de potasiu.

8. Amoniac N/60.

9. Soluție etalon de cupru: se dizolvă 250 mg cupru electrolitic în 2 ml acid azotic concentrat p.a. Se încălzește pînă la încetarea degajării vaporilor nitroși. Se adaugă 2 ml SO_4H_2 concentrat și se continuă încălzirea cu degajare de vapori albi. Se trece într-un balon cotat de 1 000, se completează și se face diluția finală 4 ml la 1 000 ml apă.

1 ml = 1 μg Cu.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se iau 2 ml ser și se adaugă 1 ml HCl 2N. Se agită și se lasă în repaus 10 minute, apoi se adaugă 1 ml acid tricloracetic 20%. Se agită și se lasă din nou în repaus 10 minute, apoi se centrifughează la viteză mare.

Din lichidul supernatant clar se iau 2 ml într-o pîlnie de separare 15—25 ml și se adaugă o picătură de metiloranj 0,1%, apoi acetat de sodiu 2M picătură cu picătură pînă la viraj roz-portocaliu. Pentru extragerea cuprului se adaugă 1 ml soluție stoc ditizonă diluată 1/3 și se agită pînă la colorația verde-persistentă. Se repetă extragerea încă cu 1 ml ditizonă diluată pînă la colorația verde. Se spală faza apoasă de două ori cu cîte 1 mg tetraclorură de carbon. Cele 4 extracte de tetraclorură de carbon sînt reunite și agitate un minut cu 5 ml HCl N/100. Se separă extractul de tetraclorură de carbon și se spală acidul clorhidric cu 1 ml tetraclorură de carbon, care se separă și se adaugă la primul extract. Extractele astfel reunite sînt agitate un minut cu 10 ml amoniac N/150, care antrenează excesul de ditizonă. După 5 minute de repaus se separă extractul de tetraclorură de carbon care se separă și se adaugă primului extract. Extractele astfel reunite sînt agitate un minut cu 10 ml amoniac N/50, care antrenează excesul de ditizonă. După 5 minute de repaus se separă extractul de tetraclorură de carbon și se filtrează printr-un filtru umectat cu tetraclorură. Soluția de amoniac N/50 se spală de două ori cu cîte 1 ml tetraclorură de carbon care, după separare, se folosește la umectarea filtrului.

Se completează volumul extractului exact la 10 ml cu tetraclorură de carbon, iar după 5 minute se măsoară densitatea optică a soluției violete de ditizonat de cupru la fotometrul Pulfrich, cu filtrul verde de 500 mμ și cuva de 20 mm, folosind apă bidistilată ca lichid compensator.

Curba de etalonare care exprimă densitatea optică în funcție de concentrația în cupru se construiește astfel: în pîlnia de separare se pun succesiv 0,5, 1, 2 . . . 5 ml soluție etalon de cupru conținînd 1 mg cupru % ml care se tratează ca și proba de analizat. Extincțiile acestor diluții se folosesc apoi la construirea curbei de etalonare.

Valori normale:

sînge 90 — 116 mg%;
ser 80 — 110 mg %.

Cuprul are rol de activator în formarea hemoglobinei și intră în compoziția anumitor enzime.

Valori crescute se întîlnesc în sarcină, în anemia pernicioasă, în anemia hemoragică, în boala Basedow etc.

Valori scăzute față de normal, în hipotiroidism.

Dozarea acidului oxalic

Metoda Guillaume. Acidul oxalic din serul defecat se precipită sub formă de oxalat de Ca, care se titrează cu permanganat de potasiu în mediu acid. Se fac totdeauna 2 probe paralele : una pe sînge și alta pe soluție salină, ambele fiind adiționate de aceeași cantitate de acid oxalic. Diferența finală găsită corespunde la acidul oxalic din sînge. Pe această cale se elimină întrucîtva eroarea datorită solubilității oxalatului.

Reactivi : 1. Acid tricloracetic 20%.

2. Alcool octilic pur.

3. Soluție salină. În 1 000 ml apă distilată se dizolvă : NaCl 8,50g ; sulfat de K, 0,46 g ; sulfat de Mg cristalizat, 0,25 g ; fosfat monosodic, 0,15 g.

4. Acid oxalic 0,07 g%.

5. Roșu de metil 0,03 g în 100 ml alcool de 50°.

6. Clorură de calciu 40 g%.

7. Amoniac pur.

8. Acid sulfuric normal.

9. Permanganat de potasiu N/100.

Tehnica : Într-o eprubetă se pun : 20 ml ser + 20 ml soluție de acid tricloracetic + o picătură alcool octilic. Se agită și se centrifughează. Într-un tub conic de centrifugă, notat cu *P* se măsoară 20 ml supernatant. În celălalt tub, notat cu *M* se pun : 10 ml soluție tricloracetică 20% și 10 ml soluție salină. Se măsoară în fiecare tub 2 ml soluție de acid oxalic, foarte exact. Se adaugă apoi în tuburile *P* și *M* cîte 0,5 ml Cl_2 Ca 40% și 3 picături roșu de metil, apoi NH_3 pur, agitînd, pînă cînd se obține o colorație roz. Dacă s-a trecut peste limită, se poate reveni înapoi cu acid acetic 1/10. Se lasă ambele tuburi timp de 12 ore la gheață. După acest timp se freacă pereții fiecărui tub cu o baghetă prevăzută la cap cu un inel de cauciuc. Se centrifughează cu viteză moderată 2 — 5 minute. Se decantează supernatantul și se răstoarnă tubul pe o hîrtie de filtru foarte curată. Se lasă să se scurgă astfel 2 — 3 minute, apoi se usucă cu precauție marginile. Cu ajutorul unui jet de apă se spală pereții și se desface precipitatul, utilizînd în total 5 — 6 ml H_2O distilată. Se centrifughează și se decantează ca mai sus.

Se adaugă în fiecare tub 3 ml SO_4H_2 N.

Se pune pe baie de apă clocotindă timp de 1 — 2 minute, pentru a ridica temperatura la 80° și, cu aceeași microbiuretă se pune într-unul și în celălalt tub permanganat N/100 pînă la colorația roz-persistentă. Pentru fiecare din cele 2 probe se scade volumul adăugat în exces din cel găsit. Volumul adăugat se găsește punînd într-un tub identic un volum egal de apă în care se adaugă permanganat de K pînă la aceeași colorație roz-persistentă.

Calcul. După ce s-au făcut corecțiile precedente, se scade volumul de permanganat în care s-a titrat martorul (salin) din volumul de permanganat cu care s-a titrat proba de ser. Diferența se multiplică cu 45 și dă rezultatul în miligrame de acid oxalic la 1 000 ml ser.

Valori : Acidul oxalic în sîngele normal este 0,2 mg ‰.

Oxalemia alimentară, după ingestia de alimente bogate în acid oxalic, este totdeauna ușoară și trecătoare. În anumite cazuri patologice, procentul de acid oxalic se ridică și poate varia între 0,002 și 0,040 g ‰.

LICHIDUL CEFALORAHIDIAN

Recoltarea lichidului cefalorahidian se execută pe nemîncate, prin puncție lombară sau suboccipitală în mod steril, pentru a nu falsifica rezultatele examenelor bacteriologice. Se extrage o cantitate de 10 — 20 ml lichid, se apreciază în primul moment tensiunea sub care se află lichidul cefalorahidian, aspectul lui și apoi se trece la o serie de examene macroscopice, microscopice și chimice.

Tensiunea lichidului cefalorahidian. Aprecierea tensiunii după viteza de scurgere a lichidului cefalorahidian prin acul de puncție poate da informații greșite. Corect, tensiunea se determină cu manometrul Claude. În stare normală, tensiunea este egală cu 12 — 15 mm apă. În hipertensiune intracraniană, presiunea poate ajunge la 30 — 50 mm apă. La copii mici, măsurarea tensiunii nu are mare valoare din cauza eforturilor de plîns care măresc tensiunea.

Densitatea lichidului cefalorahidian este 1 006 și se determină cu areometrul special (areometrul mic).

EXAMENUL MACROSCOPIC

Lichidul cefalorahidian în mod normal este incolor, transparent și prin agitare nu produce spumă. În stări patologice poate fi tulbure sau purulent. În unele afecțiuni, el este colorat în galben-verzui. Această culoare se datorește bilirubinei sau biliverdinei și este indiciul unei hemoragii a sistemului nervos central sau al unor fenomene de stază ale acestui sistem. Lichidul cefalorahidian poate fi colorat în roșu datorită sîngelui pe care-l conține. Sîngele poate proveni accidental printr-un traumatism legat de puncție sau poate avea o semnificație patologică. Dacă sîngele vine dintr-un vas lezat prin puncție, numai primele picături sînt sanguinolente și, în acest caz, nu se va lua în considerare decît lichidul care se scurge ulterior. În unele cazuri (meningite tuberculoase), păstrarea lichidului în eprubetă timp de 24 de ore la temperatura camerei duce la formarea unui văl din cauza hiperproteinorahiei.

EXAMENUL MICROSCOPIC

(vezi Capitolul ,,Bacteriologie'')

EXAMENUL CHIMIC

Se face numai pe lichid cefalorahidian centrifugat. În mod obligatoriu se impun următoarele determinări : dozarea proteinelor, glucozei, acetonei, clorurilor și ureei.

Dozarea proteinelor

Se face prin mai multe metode, pe lichid nehemolizat și lipsit de elemente figurate.

Metoda Pandy este o reacție calitativă, care arată o creștere a proteinelor și se bazează pe următorul principiu : soluția saturată de fenol precipită lichidul cefalorahidian în care concentrația proteinelor depășește o anumită limită.

Reactivi : soluție saturată de fenol. Se dizolvă 10 g fenol cristalizat în 100 ml apă distilată. Reactivul se folosește după 5 zile de la preparare. În acest timp se formează un strat uleios pe fundul vasului, care se îndepărtează prin decantare.

Tehnica. Într-un tub de hemoliză sau sticlă de ceasornic se pun 1 — 2 ml soluție saturată de acid fenic (10%), peste care se picură cu o pipetă Pasteur 1 — 2 picături de lichid cefalorahidian. Reacția se va citi pe fond negru, așteptînd 1 — 3 minute. Lichidul cefalorahidian normal dă numai o foarte fină opalescență. Dacă se produce o opalescență intensă cu aspect lăptos sau un precipitat floconos, reacția este pozitivă. Intensitatea reacției se înseamnă +, ++, +++.

Reacția este pozitivă în meningite, tifos exantematic, paralizie progresivă și tumori ale măduvei spinării.

Metoda Nonne-Appelt este o reacție calitativă pentru globuline ; ele sînt precipitate *prin soluții saturate de sulfat de amoniu.*

Reactiv : Soluție saturată de sulfat de amoniu ; se dizolvă 85 g sulfat de amoniu în 100 ml apă distilată. Se fierb, apoi se lasă la temperatura camerei pentru a se răci. După 24 de ore se depun cristale pe fundul vasului. Supernatantul trebuie să aibă o reacție slab alcalină. În caz că soluția prezintă o reacție acidă, se alcalinizează cu o soluție concentrată de amoniac.

Tehnica. Într-un tub de hemoliză care conține circa 1/2 ml dintr-o soluție apoasă de sulfat de amoniu saturată la cald (85%) se adaugă cu o pipetă, astfel pentru a nu se amesteca, 1/2 ml de lichid cefalorahidian. Peste 2 — 3 minute, dacă se formează la linia de demarcație a lichidelor un inel de precipitare, aceasta indică o creștere patologică a globulinelor.

Reacția prezintă diferite grade de intensitate, care se înseamnă cu +, ++, +++ și este pozitivă în meningitele luetice în care globulinele cresc cantitativ între 1 și 4 g‰.

Metoda Sicard este metoda cel mai mult practicată în clinică pentru punerea în evidență a albuminelor în lichidul cefalorahidian ; ea constă în precipitarea la cald a albuminei cu acid tricloracetic concentrat 33%.

Aparatura. Rahialbuminometrul Sicard este un tub de sticlă gradat în mililitri pînă la 4 ml. Primii 2 ml prezintă cîte 5 subdiviziuni.

Tehnica. Se pun în albuminometru 4 ml lichid cefalorahidian și se încălzesc la 80—90°. Se adaugă 12 picături de soluție de acid tri, cloracetic 30%. Se astupă cu dop de cauciuc, se agită și se lasă în repaus în poziție verticală 24 de ore.

Se citește nivelul precipitatului format : un precipitat mai mic decît pînă la prima diviziune este dat de un lichid cefalorahidian normal.

Diviziunea 1 corespunde la 22 mg% albumină (nivel la care se ridică precipitatul floconos, după 24 de ore).

Diviziunea 2 corespunde la 40 mg% albumină.

Diviziunea 3 corespunde la 56 mg% albumină.

Diviziunea 4 corepsunde la 71 mg% albumină.

Diviziunea 5 corespunde la 85 mg% albumină.

Dacă precipitatul format depăşeşte diviziunile albuminometrului se diluează lichidul cu soluţie cloruro-sodică 9 ‰ şi se scade proporţional numărul de picături de acid tricloracetic 33 %, iar la calcul se ţine seama de diluţia făcută.

Valorile normale sînt : 12—20 mg albumină % ml lichid cefalorahidian.

Metoda Heller constă în precipitarea albuminei cu acid nitric-nitros, identic ca şi la examenul urinii. Apariţia unui inel de precipitare la zona de separare între lichidul cefalorahidian şi reactivul Heller în 2—3 minute corespunde unei concentraţii de proteine de 0,033 g‰.

Determinarea cantitativă se efectuează prin metoda diluţiilor, metodă aplicată la determinarea albuminelor în urină.

Electroforeza lichidului cefalorahidian

Pentru a putea aplica metoda electroforezei în studiul lichidului cefalorahidian, lichid sărac în proteine, se va proceda mai întîi la o concentrare a lui. În acest scop este nevoie de cantităţi mai mari, circa 20 ml. Metodele de concentrare sînt aceleaşi ca la sucul gastric.

Electroforeza pe hîrtie a lichidului cefalorahidian este identică cu cea a serului. În lichidul cefalorahidian se găsesc aceleaşi fracţiuni de proteine ca şi în ser, plus o prefracţiune numită prealbumină, care migrează mai repede decît albumina şi care este în cantitate mai mare în materialul recoltat din ventricul şi mai redusă în lichidul lombar.

În lichidul cefalorahidian blocat lipseşte prefracţiunea şi electroforegrama seamănă mult cu aceea a serului.

În lichidul cefalorahidian normal, β-globulinele sînt crescute, iar α- şi γ-globulinele sînt foarte mult reduse în comparaţie cu valorile serului.

Valorile obţinute prin electroforeză sînt relative, de aceea este necesară determinarea cantitativă a proteinelor totale, determinare care se efectuează prin metoda Kjeldahl.

Proteinograma în lichidul cefalorahidian normal

Cantitatea proteinelor din lichidul cefalorahidian variază cu vîrsta.

Pînă la 60 de ani, proteinorahia normală este între 20 şi 45 mg %ml lichid cefalorahidian.

Peste 60 de ani, proteinorahia normală este între 60 şi 61 mg %ml lichid cefalorahidian.

Valorile normale ale fracţiunilor proteice din lichidul cefalorahidian sînt :

— fracţiunea prealbuminică = 8 % ;
— fracţiunea albuminică = 53 %.
— α-globulinele = 15 % ;
— β-globulinele = 10 % ;
— γ-globulinele = 14 %.

În lichidul cefalorahidian s-au pus în evidenţă şi două fracţiuni lipoproteice ; una corespunde, din punctul de vedere al mobilităţii, cu α-lipoproteina serului şi alta cu o mobilitate mai mare. β-lipoproteina care predomină în ser este absentă în lichidul cefalorahidian.

Lichidul cefalorahidian este mult mai sărac în proteină şi lipoproteină decît serul.

Valorile normale ale proteinorahiei.

Proteinele totale	20 — 45 mg%.
Globulinele	3,5 — 12 mg%.
Albumine	16,5 — 33 mg%.

Raportul $\frac{\text{globuline}}{\text{albumine}} = 0{,}20 - 0{,}40.$

Dozarea glucozei

Trebuie executată cu micrometoda Hagedorn-Jensen descrisă la sînge, imediat după recoltarea lichidului.

Pentru orientare se pot efectua reacţiile Haines şi Fehling.

Metoda Haines constă în reducerea hidroxidului de cupru în oxid de cupru în prezenţa glucozei.

Reactivul Haines. Se dizolvă sulfat de Cu 2 g în 5 ml apă distilată, după dizolvare se adaugă 15 g glicerină şi apoi 150 ml din soluţie NaOH 5%. Reactivul se păstrează indefinit.

Tehnica. Se pune într-o eprubetă 1 ml reactiv, se încălzeşte pînă la fierbere, se adaugă apoi 1 ml lichid cefalorahidian, se reîncălzeşte şi se citeşte culoarea apărută.

Culoarea roşie-galbenă corespunde la 60 mg% (glicorahie normală).

Culoarea violetă corespunde la 30 mg% (glicorahie scăzută).

Culoarea albastră corespunde la 20 mg% (glicorahie foarte scăzută).

Dacă culoarea este roşie, se reface reacţia cu lichidul diluat 1/2 în apă distilată.

Metoda Fehling a fost descrisă la sînge şi urină. Pentru lichidul cefalorahidian, tehnica este următoarea : la 2 ml lichid se adaugă 0,2 ml soluţie Fehling. Amestecul se introduce în baia de apă la fierbere. Un lichid cefalorahidian, care conţine între 20 şi 30 mg glucoză la 100 ml, dă o coloraţie albastră, în timp ce un lichid normal colorează amestecul în portocaliu.

Glicorahia normală este cuprinsă între 40 şi 80 mg%.

Glicorahia este crescută în cazurile de diabet, în congestii meningiene, meningite puriforme aseptice, encefalite, tumori cerebrale, hipertonii esenţiale, epilepsie şi uneori în poliomielită.

Glicorahia este scăzută în meningita tuberculoasă şi în meningitele acute.

Dozarea acetonei

Metoda Frommer-Emiliwiez

Reactivi : 1. Aldehida salicilică 10 % în alcool 95°.

2. Hidroxid de potasiu în pastile.

Tehnica. La 2 ml lichid introdus într-o eprubetă se adaugă 2 picături de aldehidă salicilică 10% şi o pastilă de hidroxid de potasiu, apoi se încălzeşte uşor. În prezenţa acetonei apare o culoare roşie-portocalie în jurul pastilei de hidroxid de sodiu.

Reacţia prezintă un test de mare valoare în diagnosticul comei diabetice sau în studiul cazurilor de acidoză.

Dozarea clorurilor

Metoda Volhard. La 1 ml lichid centrifugat se adaugă 10 ml azotat de argint N/50, plus 2,5 ml acid azotic concentrat şi 2 ml alaun feric 5%. Se titrează excesul de azotat de argint cu sulfocianura de potasiu N/50, pînă cînd apare o culoare roşie-portocalie, care trebuie să persiste 30 de secunde.

Calcul : mg ClNa %ml L.C.R. = (10-n) × × 1,17 × 100.

1 ml azotat de argint N/50 = 1,17 mg ClNa.

n = numărul de ml de sulfocianură N/50 folosiţi la titrare.

În lichidul cefalorahidian normal, clorurile variază între 7,20 şi 7,50 g‰.

Valorile crescute merg paralel cu acelea din sînge. Valori crescute se găsesc în nefrite (retenţie de cloruri) abcese şi tumori cerebrale.

Clorurile scad în meningita acută şi în afecţiunile sifilitice. Clorura de sodiu sub 5 g‰ indică aproape sigur meningita tuberculoasă. Clorura de sodiu peste 6,5 g‰ exclude meningita tuberculoasă. Cînd clorura de sodiu este cuprinsă între 5,5 şi 6,5 g ‰ formula are mare importanţă : limfocitoza indică meningita tuberculoasă ; polinucleoza indică meningita nebacilară.

Dozarea ureei

Metoda Kowarsky se aplică pentru determinarea ureei în lichidul cefalorahidian. Se lucrează pe 2,5 ml lichid cefalorahidian centrifugat (lichidul cefalorahidian nu se deproteinizează).

Ureea în lichid urmează aceleaşi modificări ca în sînge.

Valorile normale pentru uree se înscriu între 14 şi 20 mg%.

Valori crescute sînt găsite în meningite, nefrite şi mai ales în uremie.

În lichidul cefalorahidian se mai pot determina : azotul restant, acidul uric, creatinina, colesterolul, după metodele descrise la sînge.

Lichidul cefalorahidian din punct de vedere chimic este foarte asemănător cu plasma. Tabelul de mai jos cuprinde date comparative dintre principalele elemente din plasmă şi sînge.

TABELUL 64

Principalele elemente din plasma şi lichidul cefalorahidian

	Plasmă (mg %)	Lichid cefalorahidian (mg%)
Proteine	6 300 – 8 500	16 – 38
Aminoacizi	4,5 – 9	1,5 – 3
Creatinină	0,7 – 2	0,4 – 2
Acid uric	2,9 – 69	0,5 – 2,8
Colesterol	100 – 150	absent
Uree	20 – 42	5 – 39
Glucoză	70 – 120	45 – 80
Cloruri (ClNa)	560 – 630	720 – 750
Fosfat anorganic	2 – 5	1 – 2
pH	7,3 – 7,4	7,3 – 7,4
Sodiu	325	325
Potasiu	20	12 – 17
Magneziu	1 – 3	3 – 3,6
Calciu	9 – 11	4 – 76
Acid lactic	10 – 32	8 – 27

Reacţii de floculare

Reacţia cu benzoe coloidală constă în tratarea lichidului cefalorahidian cu rezină de benzoe.

Reactivi : 1. Ser fiziologic.

2. Rezină de benzoe 10% în alcool. Se mojarează bine 10 g benzoe de Sumatra, apoi se

trece într-un flacon, se adaugă 100 ml alcool absolut, se agită și se lasă 72 de ore la termostat 37°. Se centrifughează, iar lichidul supernatant se conservă multă vreme la temperatura laboratorului.

3. În momentul întrebuințării se amestecă 0,3 ml soluție benzoe cu 20 ml apă bidistilată încălzită la 35° într-o baie de apă.

Tehnica. Se iau 16 eprubete de hemoliză numerotate de la 1 la 16, în care se pipetează cantitățile de soluție, clorură de sodiu $8^{0}/_{00}$ și cantitățile de lichid cefalorahidian conform tabelului, la care se adaugă 1 ml soluție coloidală (reactivul 3).

Nr. tubului	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ser fiziologic	0,25	0,50	1,50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lichid cefalorahidian	0,75	0,50	0,50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Soluție coloidală (3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Se ia 1 ml din eprubeta nr. 3 și se trece în eprubeta nr. 4 se amestecă și operația se repetă pînă la eprubeta nr. 16

Sistemul se agită ușor și se lasă 24 de ore la temperatura camerei. Eprubeta nr. 16 este considerată *martor*.

Citirea reacției. În eprubetele în care reacția este negativă, suspensia păstrează aspectul său inițial uniform, opalescent, ca și martorul, în timp ce în cele cu reacție pozitivă, floculația este totală, lichidul perfect clarificat, iar rezina depozitată pe fundul eprubetei.

Pentru notarea rezultatelor se folosește un sistem de 2 axe de coordonate trecînd pe abscisă numerele de ordine ale celor 16 eprubete, iar pe ordonată, gradul de intensitate a reacțiilor.

Reacția negativă se notează cu 0.

Reacția slab pozitivă, cu 1.

Reacția pozitivă, cu 2.

Cu un lichid normal se obține o floculare limitată în general la eprubetele cu nr. 6—9.

Tip de reacție negativă. Lichidele patologice provenite de la bolnavi cu afecțiuni nespecifice au o zonă de floculare intensă mai mult sau mai puțin spre dreapta, niciodată spre stînga.

În cazul lichidelor provenite de la bolnavi de sifilis, zona de floculare se află în partea stîngă: în eprubetele cu nr. 1—9, uneori pînă la eprubeta cu nr. 13.

Reacția este pozitivă în paralizia generală, sifilisul cerebrospinal, meningita tuberculoasă, scleroza în plăci.

Teste dinamice

Permeabilitatea la nitrați stabilește alterarea permeabilității meningiene prin determinarea nitraților în lichidul cefalorahidian. 1 g nitrat de sodiu dizolvat în 100 ml apă pentru 30 kilocorp este ingerat cu 3 ore înainte de puncție.

Reactivi: 1. Acid sulfuric concentrat p.a.

2. Difenilamină 1 % dizolvată în acid sulfuric 70 %.

3. Nitrat de sodiu 1 g $^{0}/_{00}$ (soluție etalon).

Tehnica. Într-o eprubetă se introduc 3 ml acid sulfuric + 3 picături de difenilamină. Difenilamina se adaugă cu precauție pentru a nu se amesteca cu întreg stratul de acid sulfuric, ci numai la suprafață. Peste acest amestec se pun 3 picături de lichid cefalorahidian și se amestecă ușor stratul superficial cu o baghetă. Imediat apare în prezența nitraților la limita de separare un inel albastru. Paralel cu proba de cercetat se fac 2 probe în care se pun soluții etalon de concentrații cunoscute.

După 5 minute, cînd inelele colorate sînt bine conturate, se agită întreg conținutul eprubetelor pentru uniformizarea culorii și se compară pe un fond alb proba de cercetat cu probele etalon sau citirea se face la colorimetru.

Lichidul cefalorahidian conține în mod normal 1 mg nitrați/100 ml.

SECREȚII, TRANSSUDATE, EXSUDATE

LAPTELE

Laptele este un lichid opac de culoare albă-albăstruie, cu un gust dulce și miros special, după specia animală.

Recoltarea laptelui se face cu ajutorul unei pompe, și se extrage la începutul, la mijlocul și la sfîrșitul unei alăptări. Cantitatea extrasă trebuie să fie de cel puțin 10 ml pentru fiecare priză. Se amestecă toate probele, obţinîndu-se astfel un lapte de o compoziţie omogenă care se examinează macroscopic, microscopic şi chimic.

EXAMENUL MACROSCOPIC

Constă în aprecierea aspectului, culorii şi consistenţei.

EXAMENUL MICROSCOPIC

Laptele se prezintă sub aspectul unei emulsii formate dintr-o parte lichidă (lactoplasma) şi din mici globule de grăsime.

EXAMENUL CHIMIC

Reacţia laptelui este uşor alcalină şi se determină cu ajutorul hîrtiei de turnesol.

Densitatea este de 1 028—1 035; se determină cu un lactodensimetru sau cu un densimetru obişnuit.

Laptele conţine apă, săruri, proteine, glucide, lipide, vitamine, lecitină, colesterol şi o serie de diastaze, ca amilaza, catalaza, pepsina şi tripsina.

Sărurile minerale sînt formate din cloruri şi fosfaţi de sodiu, potasiu, calciu şi magneziu, plus urme de fier, citraţi alcalini, fluor şi siliciu.

Extractul sec şi sărurile minerale sînt determinate în felul următor: se măsoară într-un creuzet de platină tarat 5 ml lapte şi se ţine în etuvă la 105°, timp necesar pentru evaporarea lichidului, apoi capsula se răceşte într-un exsicator şi se cîntăreşte.

Calcul: greutatea extractului $\times 200 =$ mg extract sec la $^0/_{00}$ ml lapte. Se calcinează creuzetul de platină pînă se obţine o pulbere albă (nu se încălzeşte la roşu aprins). Se răceşte creuzetul într-un exicator şi se cîntăreşte din nou.

Calcul: greutatea cenuşii $\times 200 =$ mg săruri minerale la $^0/_{00}$ ml lapte.

Cercetarea proteinelor

Cazeina reprezintă proteina principală a laptelui. În structura ei intră acizi aminaţi indispensabili nutriţiei. În afară de această proteină se mai găsesc mici cantităţi de lactalbumină şi lactoglobulină.

Dozarea cazeinei. Într-un vas Erlenmeyer se precipită 5 ml lapte cu 50 ml alcool de 96°, la care se adaugă 2 picături de acid acetic concentrat. După cîteva ore de repaus se filtrează precipitatul prin două filtre tarate de aceeaşi greutate şi se spală bine cu un amestec de alcool eter. Ultima spălare se face numai cu eter. Se usucă filtrul la etuvă pînă la greutate constantă şi se cîntăreşte. *Calcul*: greutatea precipitatului uscat $\times 200 =$ mg cazeină la $^0/_{00}$ ml lapte.

Cercetarea lipidelor

Metoda Adam determină untul din lapte.

Reactivi: 1. Alcool amoniacal: amoniac pur 30 ml + alcool de 90° 833 ml şi se completează cu apă distilată la 1 000 ml.

2. Soluţie Adam: alcool amoniacal 100 ml + eter 100 ml.

Tehnica. Se introduc într-o pîlnie de separare 10 ml lapte bine omogenizat şi 22 ml soluţie Adam.

Se agită de cîteva ori pîlnia pentru a se obţine amestecarea soluţiilor şi se lasă în repaus 1/2 oră. În partea superioară a pîlniei se separă grăsimile. Pătura inferioară se culege într-un balon de 50 ml, care serveşte la dozarea lactozei. Se spală grăsimile cu cîţiva ml de apă distilată care sînt trecuţi într-un balon peste prima soluţie. Grăsimile astfel spălate sînt trecute într-o capsulă cîntărită, iar pîlnia se spală cu cîţiva ml eter, care se pun de asemenea în capsulă. Se evaporă conţinutul capsulei mai întîi la temperatura camerei şi apoi într-o etuvă la 100°. După răcire în exsicator se cîntăreşte capsula.

Calcul: greutatea reziduului $\times 100 =$ g lipide la $^0/_{00}$ ml lapte.

Cercetarea lactozei

Se poate face polarimetric, refractometric sau chimic.

Metoda Deniges este o metodă chimică de determinare a lactozei.

Reactivi: 1. Reactiv Patein nitromercuric care se prepară astfel: 160 ml acid azotic 40° Bé (densitate 1,39) + 220 g oxid roşu de mercur.

Se adaugă cîte puţin oxid roşu de mercur, agitînd continuu, pentru a se evita formarea de grunji. După 5—6 minute şi numai în cazul în care nu s-au format grunji mari de oxid mercuric, se adaugă apă distilată 160 ml. Amestecul se fierbe; după dizolvarea totală a oxidului se răceşte soluţia şi se adaugă puţin cîte puţin 40 ml soluţie de hidrat de sodiu obţinută din: 1 vol. NaOH 33% + 3 vol. apă.

Soluția se agită puternic și se trece cantitativ într-un balon cotat de 1 000 ml, se completează la semn cu apă, se amestecă și se filtrează. Reactivul se conservă în sticlă galbenă și este inalterabil.

2. Pulbere de zinc.

3. Soluție Fehling sau reactivul Benedict al cărui titru a fost stabilit cu o soluție de 1% de lactoză anhidră (vezi Capitolul ,,Explorarea biochimică a funcției de excreție").

Tehnica. În balonul cotat de 50 ml în care s-a făcut colectarea laptelui degresat cu soluția Adam se adaugă 4 ml reactiv nitromercuric și se completează cu apă pînă la semn. Se amestecă și se filtrează. La filtratul limpede se adaugă 2 g pulbere de zinc pentru a elimina mercurul. Se agită și după o oră, se iau din filtrat 25 ml, care se trec într-un balon cotat de 50 ml, se neutralizează cu o soluție de NaOH în prezența unei hîrtii de turnesol, se completează pînă la semn cu apă distilată și se filtrează. S-a obținut astfel o diluție de lapte 1/10. Dozarea se face cu soluția Fehling sau cu reactivul Benedict, titrat în prealabil cu o soluție de lactoză 1%.

Compoziția laptelui de femeie este următoarea:

	Maximum	Minimum
Apă	87%	—
Densitate	1,035	1,028
Extract	16,38%	11,20%
Unt	6,18%	1,75%
Caseină	1,40%	0,85%
Lactoză anhidră	7,76%	6,76%
Săruri	0,27%	0,10%

Colostrul. În primele zile după naștere, glanda mamară secretă un lichid gros, gălbui și mai dens decît laptele (densitatea 1,050). El conține globule de grăsime, leucocite și o serie de elemente muriforme, fără nucleu, numite corpusculi de colostru.

LICHIDELE PATOLOGICE DE PUNCȚIE

Lichidele de puncție se clasifică în lichide inflamatoare, numite exsudate, în lichide de origine mecanică, numite transsudate și în lichide din chisturi de retenție.

Orice lichid de puncție este examinat macroscopic, microscopic, bacteriologic și chimic.

EXAMENUL MACROSCOPIC

Exsudatele sînt lichide seroase ușor opalescente în mod normal și purulente, hemoragice și lactescente în cazuri patologice.

Transsudatele sînt în mod normal lichide, transparente, rar în cazuri patologice apar purulente.

EXAMENUL MICROSCOPIC

(vezi capitolul ,,Bacteriologia")

EXAMENUL CMIMIC

1. Densitatea lichidelor de puncție se determină cu urodensimetrul.

Transsudatele au densitatea de 1 006—1 015, cele de tumori, de 1 018—1 025, iar exsudatele de 1 018—1 022.

2. Proteinele în lichidele de puncții sînt puse în evidență prin reacția Rivalta.

La transsudate, reacția Rivalta este de obicei negativă, iar la exsudație reacția este pozitivă.

Reacția Rivalta se execută în felul următor: într-un cilindru de sticlă gradat se pun 300 ml apă distilată + 3 picături de acid acetic glacial (orice altă proporție poate da rezultate false, în special un exces de acid duce la solubilizarea proteinelor acidosolubile). Dacă picurînd din lichidul de examinat în această soluție se obține o opalescență ca un fum de țigară, reacția este pozitivă (exsudat); dacă nu se produce nici o modificare, reacția este negativă (transsudat).

Reacția Rivalta poate să diferențieze transsudatul (cu 1—3% proteină în cursul unei staze generale circulatorii ori în afecțiuni renale) de exsudat (peste 4% proteină de natură inflamatoare); celelalte componente, ca proteinele, glucidele, sărurile în lichidele de puncție, sînt determinate după tehnicile utilizate la urină sau sînge.

Electroforeza. Lichidele respective după o prealabilă concentrare ca în cazul lichidului cefalorahidian sau sucului gastric față de o soluție de polivinil 20% sînt cercetate electroforetic, atît pe hîrtie, cît și pe gel. Tehnica este cea descrisă în Capitolul ,,Chimie fizică".

BIBLIOGRAFIE

Capitolul: METODE FIZICO-CHIMICE DE ANALIZĂ

ASATIANI B. K. — Biohimiceskaia Fotometria, Izdatelistvo Akad. Nauk S.S.S.R., Moscova, 1957.

AUSTERWEIL G. V. — L'échange d'ions et les échangeurs, Ed. Gauthier-Villars, Paris, 1955.

BALȘ M., VOICULESCU M. — Examene curente de laborator necesare medicului de spital, ed. a II-a. Ed. I.M.F., București, 1947.

BALAHOVSKII C. D., BALAHOVSKII I. C. — Metodî himiceskovo analiza krovi, Medghiz, Moscova, 1953.

BĂNĂȚEANU I., CĂLUŞARU A., SLABU Z. — Metode fizico-chimice de analiză, Ed. tehnică, Bucureşti, 1961.

BLAUTH I. O., WAKSMUNDZKI A., KAUSKI M. — Cromatography. Symposium, P.W.N., Warşovia, 1957.

BLOCK R., DURRUM EL., ZWEI G. — A manual of paper cromatography and paper electrophoresis, Acad. Press, New York, 1955.

DITTMER A. — Papier elektrophorese. Grundlagen, Methodik, Klinische Betrachtungen, G. Fischer, Jena, 1956.

DONALDSON P.E.K. — Electronic apparatus for biological research. Butterworth, Londra, 1958.

DORABIALSKA A. — Lucrări practice de chimie fizică, Ed. tehnică, Bucureşti, 1958.

GLICK D. — Methods of biochemical analysis, 4 vol., Acad. Press., New York, 1954—1956.

HAIS şi MACECK — Cromatografia, Ed. tehnică, Bucureşti.

HOPPE-SEYLER — Handbuch der physiologisch und patologisch Chemischenanalyse, Ed. Springer, Berlin, 1953—1955.

HEIFEȚ V. L., ADVEEV D. K., REIŞAHRIT L. S. — Lucrări practice de electrochimie, Ed. tehnică, Bucureşti, 1958.

IOFFE B.V. — Refractometrie pentru chimişti, Ed. tehnică, Bucureşti, 1958.

IDU S. M., CÎMPEANU S. — Electroforeza, Ed. medicală, Bucureşti, 1957.

LEDERER M. — Journal of chromatography. Elsevier Publishing Co., Amsterdam.

LEDERER E., LEDERER N. — Chromatography. A rewiev of principles and aplication. Vol. I—III, Ed. Elsevier Publishing, Co. Amsterdam, 1958—1960.

LEDERER E., LEDERER N. — Chromatography. Ed. Elsevier Publishing, Co. Amsterdam, 1957.

LIALIKOV I. S. — Metode fizico-chimice de analiză. Ed. tehnică, Bucureşti, 1953.

NACHTRIEB N. H. — Principles and practica of spectrochimical analysis, Mc. Grow-Hill Book Co., New York, 1950.

OUCHTERLONA O. — *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1949, nr. 26, p. 507.

OUDIN J. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, nr. 75, p. 30.

PASERE E., BĂRBULESCU G. — Aparate electrice şi electronice din laboratoarele industriale, Ed. tehnică, Bucureşti, 1961.

TĂNĂSESCU GH., COSTESCU G. — Biochimie medicală. Curs de lucrări practice, Ed. I.M.F., Bucureşti, 1962.

WUNDERLY C. — Eléctrophorèse sur papier, Ed. Vigot, Paris, 1956.

ZAGORSKI Z. — Automatizarea în chimia analitică (traducere din limba polonă), Ed. tehnică, Bucureşti, 1961.

Capitolul : METABOLISME ŞI BIOCHIMIE MEDICALĂ

AGASSE-LAFONT E. — Biologie médicale, Ed. Vigot Frères, Paris, 1956.

AGASSE-LAFONT E., ORINBERG J. — Le laboratoire, vol. 1—3, Ed. Vigot Frères, Paris, 1952—1956.

AGASSE-LAFONT E., ORINBERG J. — Documentaire des constantes biologiques et de leurs applications médicales et chirurgicales, L'expansion Scientifique Française, Paris, 1959.

ARDAY F. R., PILLMER L., LIPOW T. H. — *J. Immunol.*, 1959, nr. 82, p. 458.

BARNETT R. J., SELIGMANN A. M. — *Science*, 1951, nr. 114, p. 579.

BESSON R., FAUVERT R. — *Rev. franç. Clin. Biol.*, 1958, nr. 3, p. 673.

BENHAMON J. P., BESSON R. — *Path. Biol.*, 1959, nr. 7, p. 111.

BETT I. M., FRASER G. P. — *Biochem J.*, 1958, nr. 68, p. 13.

BETT I. M., FRASER G. P. — *Clin. Chem. Acta.*, 1959, nr. 4, p. 346.

BESSY O., LOWRY D. H., BROCK M. J. — *J. Biol. Chem.* 1946, nr. 164, p. 321.

BLOOR W. R. — *J. Biol. Chem.*, 1916, nr. 24, p. 227.

BLANK B. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, nr. 41, p. 891.

BOIVIN P., HUGON M. P., HARTMANN L. — *Rev. franç. Clin. Biol.*, 1959, nr. 4, p. 812.

BOSELLI A., MAFFEZZOLI A., LUSARDI C., DELLA-PORTA G. — *Minerva Med.* 1951, nr. 42, p. 140.

BODANSKY A. — *Amer. J. Clin. Path.* (Supll.), 1937, nr. 7, p. 51.

BRIGGS A. P. — *J. Biol. Chem.*, 1924, nr. 59, p. 255.

BRUMPT L., DE TRAVERSE P. M., COQUELET M. L. — *Ann. Biol. Clin.*, 1957, nr. 15, p. 567.

BRÜCKNER J. — *Amer. J. Clin. Path.*, 1959, nr. 52, p. 513.

BRÜCKNER J. — *Clin. Acta*, 1961, nr. 6, p. 370.

BURTIN P.— *Bull. Soc. Chim.Biol.*, 1954, nr. 36, p. 1 021.

BUSARD A., PERRIN D. — *J. Lab. clin. Med.*, 1955, nr. 46, p. 689.

BURSTEIN M., SMAILLE J. — *C. R. Acad. Sci.* , 1956, nr. 243, p. 2185.

BURTIN P., GRABAR P., BOUSSIER G., JAYLE M. F. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, nr. 36, p. 1029.

CAMPBELL P. N. — *Biochem J.*, 1959, nr. 71, p. 148.

COQUELET M. L., DE TRAVERSE P. M. — *Ann. Biol. Clin.*, 1959, nr. 17, p. 498.

COHN E. J., HUGHES Wl., WEARE JH. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1947, nr. 69, p. 1 753.

COHN P. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1959, nr. 33, p. 284.

COHEN S. — *J. Biol. Chem.*, 1944, nr. 156, p. 691.

COLIN J., POLONOVSKI C. — *Ann. Biol. Clin.*, 1952, nr. 5—6, p. 267.

CROOK E. M. — Ciba Symposium on Paper Electrophoresis, J. A. Churchill, Londra, 1956.

DAVIDOF S. — *Ann. Biol. Clin.*, 1951, nr. 9, p. 386.

DEPRAITERE R., TRAVERSE P. M., COQUELET M. L. — *Ann. Biol. Clin.*, 1957., nr. 10—12.

DELORME M. L., DARNIS F., FAUVERT R. — *Rev. franç. Ét. Clin. Biol.*, 1958., nr. 9, p. 967.

DEBOT M. P. — *J. Méd. Bordeaux*, 1960, vol. 137, nr. 3, p. 253.

DEUTSCH H. F. — *Science*, 1957, nr. 125, p. 600.

DEUTSCH H. F., MORTON J. I. — *J. Biol. Chem.*, 1958, nr. 231, p. 1 107.

DEBRÉ ROBERT, LELONG MARCEL — Pédiatrie, Ed. Flammarion, Paris, 1952.

DOLE V. — *J. Clin. Invest.*, 1944, nr. 23, p. 708.

DRABKIN D. L. — *J. Biol. Chem.*, 1946, nr. 164, p. 703.

DREYFUS J.—Semeiologie électrophorètique des proteines du plasma sanguin et de l'hémoglobine, Lyon, 1955.

DURRUM EL., PAUL M. H., SMITH E. R. — *Science*, 1952, nr. 116, p. 428.

FINE J. M., UTIEL J., FAURE J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, nr. 38, p. 649.

FONTY P. — *Ann. Biol. Clin.*, 1961, vol. 19, nr. 7—9, p. 637.

FOSS M. P., HAUCKER L. V., VAN SLYKE D. D. — *Clin. Clim. Acta*, 1960, nr. 5, p. 301.

FOLIN O., WU H. — *J. Biol. Chem.*, 1920, nr. 41, p. 367.

FRIEDMAN H. — *Anal. Chem.*, 1953, nr. 25, p. 662.

FRANCZ J. C., EYQUEM A., GRABAR P. — Rev. Fr. Ét. Clin. Biol. 1959/4/821.

FRAUKLIN E. C., KUNKEL H. G. — *J. Immunol.* 1957, nr. 78, p. 11.

FUENTA HITA F. — *Ann. Biol. Clin.* 1950, nr. 8, p. 494.

FRASER D., YENDT ER., CHRISTIE P. H. — *Cancer*, 1955, p. 268.

GALE E. F. — *Biochem. J.*, 1958, nr. 69, p. 611.

GAJDOS A., GAJDOS TOROK M. — *Path. Biol.*, 1957, nr. 3.

GORDON R. S. — *Lancet*, 1959, nr. 1, p. 325.

GOA J. — On protein-bound carbohydrates in human serum, Jönköping (Suedia), A. Halls, 1955.

GEORGESCU P., PĂUNESCU E. — Metode biochimice de diagnostic şi cercetare, Ed. medicală, Bucureşti, 1960.

GOETZE E. — Einrichtung und Methoden der Klinischen Laboratoriums, Ed. Gustav Fischer, Jena, 1959.

GRABAR P., WILLIAMS C. A. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, nr. 10, p. 195.

GRABAR P. — *Adv. in Protein Chem.* 1958, nr. 13, p. 1.

GRABAR P., WILLIAMS C. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, nr. 10, p. 193.

GRABAR P., WILLIAMS C. — *Biochim. Biophys. Acta.*, 1955, nr. 17, p. 65.

GRASSMAN W., HANNIG K., KNEDEL M. — *Deutsch. Med. Wschr.*, 1951, 76, 333.

GRABAR P. — *Therapie*, 1954, nr. 9, p. 163.

GRABAR P. — Rapports présentés le 19.V. 1954, Paris.

GRAY S., HUGGINS — *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1942, nr. 50, p. 357.

GRIGAUT C. R. — *Soc. Biol.*, 1910, nr. 68, p. 791.

GRADWOHL R. B. H. — Clinical laboratory methods and diagnosis, ed. a V-a, vol. 1 şi 2, Ed. Henry Kimpton, Londra, 1958.

GUBERGRIT A. J. — Diagnosticeskoe znacenie rezultatov laboratornih issledovani, Medghiz, Moscova, 1960.

HARTMANN L., TOILLIEZ M. — *Rev. franç. Ét. Clin. Biol.*, 1957, vol. 11, nr. 2, p. 197.

HAMBURGER J., MATHÉ G., VERBIZIER J. — *Ann. Biol. Clin.*, 1950, nr. 5, p. 627.

HAZARD R., LAFITTE A. — *Presse méd.*, 1953, vol. 61, nr. 14, p. 286.

HANGER F. M. — *J. Clin. Invest.*, 1939, nr. 18, p. 261.

HAGEDORN H. E., JANSEN B. N. — *Biochem. Z.*, 1923, nr. 136, p. 46.

HARRISON A. G. — Chemical methods in clinical medicine. Their applications and interpretation with techniques of simple tests, ed. a III-a, Ed. J. et A. Churchill, Londra, 1947.

HENNING NORBERT — Klinische Laboratorium — diagnostik, Zweite Auflage, München şi Berlin, 1960.

HENRY R. J., SOBEL CH., CHIAMORI N. — *Clin. Chim. Acta*, 1958, nr. 3, p. 523.

HEREMAUS J. — *Clin. Chim. Acta*, 1959, nr. 4, p. 639.

HENRY R. — *Ann. Biol. Clin.*, 1945, p. 3 100.

HIRSCHFELD J. — *Acta path. microbiol. scand.*, 1959, 47, 169.

HOPPE-SEYLER/Thierfelder — Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse. 10 Auflage, vol. 1, 2, 3, 4, 5, Ed. Springer Berlin, 1953—1955.

JAYLE M. F., BOUSSIER G. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, nr. 36, p. 959.

JAYLE M. F., BOUSSIER G., TONNELOT J. — *Bul. Soc. Chim. Biol.*, 1959, nr. 38, p. 343.

KABAT E. A. — *J. Amer. Chim. Soc.*, 1952, nr. 74, p. 2 649.

KAMINSKI M. — *Immunol. J.*, 1955, nr. 75, p. 377.

KEKWIEK R. A. — *Biochem. J.*, 1940, nr. 34, p. 1 248.

KING E. J., JEGATHEESAN K. A. — *J. Clin. Path.*, 1959, nr. 12, p. 85.

KIND P.N., KING E. J. — *J. Clin. Path.*, 1954, nr 7, p. 322.

KOHN J. — *Clin. Chim. Acta*, 1957, nr. 2, p. 297.

KOIW E., GRONWALL A., SCAND J. — *Clin. Lab. Invest.*, 1952, p. 244.

KUNKEL HG., GRANKLIN EC., MÜLLER EBERHARD H. J. — *J. Clin. Invest.*, 1959, nr. 38, p. 424.

KUNKE H. G. — Methods of Biochemical Analysis, vol. I. Interscience Publ., New York, 1957.

KUNKEL H. R. — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1947, nr. 66, p. 217.

LEVY G., POLONOVSKI J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, nr. 40, p. 1 293.

LESTRADET H. — *Presse méd.*, 1953, nr. 61, p. 1 450.

LICHTWITZ A., SÈZE S., HIOCO D., BORDIER PH., PARLIER R. — *Sem. Hôp. Paris*, 1958, nr. 34, p. 1 000.

LITEANU C. — Editura tehnică, Bucureşti, 1956.

LIALIKOV I. S. — Editura tehnică, Bucureşti, 1953.

MANTA I., CIPLEA AL. — Metode de laborator clinic, 1944.

MAC LAGAN N. F. — *J. Exp. Path.*, 1944, vol. 25, nr. 15, p. 234.

MORETTI J., BOUSSIER G., JAYLE M. F. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, nr. 39, p. 593.

MORETTI J., BOUSSIER G., HUJOU M. P., HARTMANN L. — *Bul. Soc. Chim. Biol.*, 1959, nr. 41, p. 79.

MOARE D. H., KABAT E. A., GUTMAN A. B. — *J. Clin. Invest.*, 1943, nr. 22, p. 67.

MOROWITZ H. I. — *Bioch. Biophy. Acta*, 1960, nr. 40, p. 340.

MÜLLER-EBERHARD H. J., NILSSON şi ARONSON T. — *J. exp. Med.*, 1960, nr. 111, p. 201.

MÜLLER-EBERHARD H. J., NILSSON U. — *J. exp. Med.*, 1960, nr. 11, p. 217.

NATELSON S., SCOTT M., BEFFA CH. — *Amer. J. Clin. Path.*, 1951, nr. 21, p. 275.

NATELSON S., KASER M. — Standard Methods of Clinical Chemistry, vol. I, Ed. Academie Press, New York, 1953.

NELSON-SOMOGYI — *J. Biol. Chem.*, 1944, nr. 153, p. 375.

NENIŢESCU C. D. — Impr. C.F.R., Bucureşti, 1947.

ONCLEY J. L., GURD F. R., MELIN M. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, nr. 72, p. 458.

ONCLEY I. L., SCATCHARD P., BROWN A. — *J. Physiol. Coll. Chem.*, 1947, nr. 51, p. 84.

PĂUNESCU — PODEANU A. — Ghid de date biologice normale şi patologice, Ed. medicală, Bucureşti, 1962.

PAVLOV P. N., VOLSKA R. — Ukrain Klein Lhur, 1935, nr. 10, p. 485.

PIGNARD P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, vol.. 32, nr. 5—6, p. 401.

PLATTNER H. L. — Ed. Masson, Paris, 1954.

POPPER H., DE LA HUERGA J. — *J. Lab. Clin. Méd.*, 1950, nr. 35, p. 459.

POLONOVSKI M., JAYLE M. F. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939 nr. 21, p. 87.

PRACTORIUS E., SCAND J. — *Clin. Lab. Invest.*, 1953, nr. 3, p. 273.

RAPPAPORT F., FISHHORN F. — *Clin. Chim. Acta*, 1960, nr. 5, p. 160.

REITMAN S., FRANKEL S. — *Amer. J. Clin. Path.*, 1957, vol. 28, nr. 1, p. 56.

RODIER J., MALLEIN B. — Manuel de biochimie practique, Ed. Maloine, Paris, 1961.

SAVEL J. — *Ann. Biol. Clin.*, 1960, nr. 18, p. 61.

SANDOR G. — *C. R. Acad. Sci.*, 1959, nr. 248, p. 3 361.

SCHALES O., SCHALES S. S. — *J. Biol. Chem.*, 1941, nr. 140, p. 879.

SCHMID K. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1953, nr. 75, p. 60.

SONNET J. — Les glicoproteines sériques à l'état normal et pathologique, Ed. Acxia, Bruxelles, 1956.

SNIGER K., CHERNOFF A., SINGER L. — *Blood*, 1951, vol. 6, nr. 1, p. 413.

SMITHIES O. — *Biochem. J.*, 1955, nr. 60, p. 629.

STORCK J., ARDRY R. — *Ann. Biol. Clin.*, 1951, vol. 3 nr. 4, p. 197.

SMITH EL., BRONN E. și WEIMER, WINZLER R. J. — *J. Biol. Chem.*, 1950 nr. 185, p. 569.

TELOY H. A. — *Amer. J. Clin. Path.*, 1956, nr. 26, p. 525.

TRONCHET J. — *Ann. Biol. Clin.*, 1958, vol. 16, nr. 71, p. 459.

TISELIUS A., KABAT E. A. — *J. exp. Med.*, 1939, nr. 69, p. 119.

URIEL J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, nr. 40, p. 105.

URIEL J. — *Clin. Chim. Acta*, 1958, nr. 3, p. 234.

URIEL J., GRABAR P. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, nr. 90, p. 427.

URIEL J., SCHEIDEGGER J. — *J. Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, nr. 37, p. 167.

URIEL J., GRABAR P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, nr. 38, p. 1 253.

VALETTE G., SAVEL J., TARD M. A. — *Ann. Biol. Clin.*, 1958, nr. 16, p. 17.

VARLEY H. — Pratical clinical biochemistry, ed. a II-a William Heinemann medical books Ltd., Londra, 1958.

TODD J. C., SANFORD A. H., și WELLS B. B. — Clinical diagnosis by laboratory methods. A working manual of clinical pathology. 11 ed. Ed. W. B. Saunders, Philadelphia și Londra, 1955.

WELTMANN M. Z. — *Clin. Med.*, 1931, nr. 118, p. 670.

WENGER J., KIESNER J. B., PALMER W. L. — *Amer. J. Med.* 1957, nr. 22, p. 373.

WALDENSTRÖM J. — *Acta Med. Scand.*, 1944, nr. 117, p. 216.

WITH K., PETERSEN T. D., PETERSEN B. — *J. Chim. Path.*, 1961, nr. 14, p. 2.

WIEME R. J., RABEAV M. — *Naturwiss*, 1957, nr. 44, p. 112.

WILLIAMS C. A., GRABAR P. — *J. Immunol.* 1955, nr. 74, p. 158.

WOOD H. F., MC. CARTHY M., SLATER R. Y. — *J. exp. Med.* 1954, nr. 100, p. 71.

WUNDERLY CH., BUSTMENTE V. — *Klin. Wschr.*, 1957, nr. 35, p. 758.

ZAK — *Amer. J. Clin. Path.*, 1957, nr. 5, p. 583.

ZLATKIS, ZAK, BOYLE — *J. Lab. clin. Med.*, 1953, nr. 3, p. 486.

Capitolul : ENZIME

BODANSKY A. — *J. Biol. Chem.*, 101, 93, 1933.

BOYER P. D., LARDY H., MYRBÄCK K. — The enzymes Second edition, Academic Press, New York, vol. 1, 2, 1952, —1960.

CABAUD P. G., WROBLEWSKI F. — *Amer. J. Clin. Path.*, 30, 234, 1958.

CARAWAY W. T. — *Amer. J. Clin. Path.*, 32, 97, 1959.

CHERRY I. S., CRANDALL L. A. — *Amer. J. Physiol*, 100, 266, 1932.

COLOWICK S., KAPLAN N. O. — Methods in Enzymologie, Academic Press, New York, vol. 1, 2, 3, 4, 1955—1957.

GRÖMÖRI G. — *J. Lab. Clin. Med.*, 27, 955, 1942.

KING E. J., ARMSTRONG A. R. — *King-Armstrong Canad. Med. Assn. J.* 31, 376, 1934.

KARMEN A., WROBLEWSKI F., LA DUC J. S. — *J. Clin. Invest.*, 34, 126—131, 1955.

SOMOGYI M. — *Clin. Chem.*, 6, 23, 1960.

SMITH B. W., ROE J. H. — J. Biol. Chem., 179, 53, 1949.

TIETZ N. W., BORDEN T., STEPLETON I. — *Amer. J. Clin. Path.*, 31, 2, 148, 1959.

RICHTERICH R. — Enzymopathologie. Enzyme in Klinik und Forschung Ed. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1958.

WROBLEWSKI F., CABAND P. — *J. Clin. Path.*, 27, 235—239, 1957.

WROBLEWSKI F. — Advances in Clinical Chemistry, Acad. Press, New York, 1958.

WROBLEWSKI F., LA DUE I. — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 90, 210 — 213, 1955.

Dr. KONDI VANGHEL

HEMATOLOGIE

EXPLORAREA SERIEI ERITROCITARE

I. TEHNICI

RECOLTAREA SÎNGELUI PENTRU EXAMENE MORFOLOGICE

Sînge capilar. *Material necesar:*

— Ac Francke sau ace obişnuite de injecţii subcutanate.

— Vată, hîrtie de filtru.

— Alcool sau eter.

Sterilizarea materialului. Acul Francke este greu sterilizabil prin flambare şi folosirea lui nu se recomandă, datorită posibilităţii de a transmite anumite boli infecţioase, în special hepatita virotică. Acul Francke se poate folosi dacă se sterilizează prin autoclavare 2 ore la 2 atmosfere.

Mai comodă şi mai sigură este folosirea acelor de injecţii subcutanate, care se pot steriliza fie prin autoclavare, fie flambate la roşu, la flacăra unui bec Bunsen sau a unei lămpi cu alcool.

Condiţii generale de recoltare. Recoltarea probelor de sînge se face în mod obişnuit dimineaţa, pe nemîncate, la bolnavi odihniţi; la femei este preferabil să nu fie în timpul menstruaţiei.

La adult, pentru recoltarea sîngelui capilar se înţeapă pulpa degetului inelar sau mijlociu.

Pentru probe speciale se înţeapă lobulul urechii pentru obţinerea elementelor endoteliale ale capilarelor, ca în endocardita lentă (boala Osler).

La nou-născut, sugar şi copilul mic se înţeapă faţa plantară a degetului mare de la picior sau călcîiul.

Tehnică. După dezinfectarea şi degresarea regiunii respective, şi după evaporarea şi uscarea alcoolului sau eterului, se înţeapă pielea rapid şi suficient de adînc. Trebuie ca sîngele să ţîşnească de la sine sau după o slabă presiune. Prima picătură se şterge cu hîrtie de filtru sau vată. Recoltarea trebuie să se facă rapid şi corect şi la sfîrşit se aplică un tampon de vată cu alcool pe regiunea înţepată.

Este interzisă stoarcerea regiunii înţepate pentru obţinerea picăturii, pentru a nu dilua sîngele cu limfă.

Sînge venos. *Material necesar:*

— Seringa de diferite mărimi, de preferinţă de sticlă (Luer); cea mai potrivită este sterilizarea uscată, 1 oră la 180°. Seringa trebuie să fie perfect uscată.

— Ace cu calibrul de 1 mm şi diametrul exterior de 1,5 mm. Sterilizate ca şi seringa şi uscate.

— Vată, eter, alcool, garou.

Tehnică. Locul de puncţie: la adult este plica cotului, la sugari vena jugulară.

Cu ajutorul garoului se produce o stază venoasă, lăsînd liber fluxul arterial şi recomandînd pacientului să strîngă uşor pumnul. Se dezinfectează pielea cu alcool sau eter, apoi se efectuează puncţia.

Recoltarea sîngelui pe anticoagulant. În cazul în care examenul sîngelui se face la o oarecare distanţă de bolnav, se recomandă ca sîngele să se recolteze pe un anticoagulant pentru efectuarea probelor de numărători de eritrocite, de leucocite, de determinare a hemoglobinei, de determinare a hematocritului. Această recoltare se impune, de asemenea, cînd se urmăreşte determinarea indicilor eritrocitari. În acest caz sîngele trebuie să aibă aceeaşi origine, să provină din venă, pentru toate probele, pentru a se obţine rezultate cît mai corecte. Efectuarea numărătorii de eritrocite şi a hemoglobinei din sîngele capilar şi a hematocritului din sîngele venos poate să ducă la rezultate neconcordante în determinarea indicilor eritrocitari.

Sîngele recoltat pe anticoagulant se pretează mai puțin pentru citologie; examenul morfologic trebuie efectuat pe frotiuri întinse, la patul bolnavului, pe lame, din sînge fără anticoagulant.

Amestecul anticoagulant Wintrobe:
— oxalat de amoniu 1,2 g;
— oxalat de potasiu 0,8 g;
— apă distilată *ad.* 100 ml.

Se repartizează cîte 0,5 ml din acest amestec într-o serie de eprubete sau sticle de penicilină și se lasă cîteva zile, fără dop, la termostat la 37°, timp în care apa se evaporează complet. Nu se recomandă uscarea la temperaturi ridicate, deoarece substanțele din amestec se descompun.

Reziduul uscat este suficient pentru a recolta 5 ml sînge; după recoltare se agită ușor flaconul fără să se facă spumă. În caz că recoltarea se face într-o eprubetă, aceasta se astupă cu un dop de cauciuc și se răstoarnă de cîteva ori, cît se poate de blînd, pentru dizolvarea și omogenizarea anticoagulantului. Înainte de efectuarea numărătorilor, sîngele se va omogeniza. Pentru trimiterea probelor la distanțe mari se recomandă păstrarea lor, în timpul transportului în condiții de izotermie, la +4° sau +8°. Trebuie evitată expunerea la umezeală a lamelor cu frotiul de sînge, deoarece se produce hemoliza.

EXAMENUL SÎNGELUI PROASPĂT

Metodele folosite pentru examenul sîngelui proaspăt sînt multiple. Cea mai simplă este examenul sîngelui între lamă și lamelă. Metode mai complicate utilizează microscopia în contrast de fază, ultramicroscopia, microscopia pe fond întunecat, ombrajul.

Examenul între lamă și lamelă. După puncționarea degetului se pune pe o lamelă prima picătură de sînge și apoi lamela, cu picătura în jos, se aplică pe o lamă. Sîngele se întinde uniform, prin capilaritate, între lamă și lamelă. Se examinează la microscop imediat, cu obiectiv uscat.

Preparatele care trebuie urmărite mai multe ore se lutează pe margini cu parafină cu punct de topire 56°, cu ajutorul unei spatule încălzite.

Rezultate: la examenul în stare proaspătă eritrocitele apar discoidale, biconcave din profil, iar din față prezintă un dublu contur, partea centrală a celulei fiind mai clară; în general sînt de culoare galbenă. Se pot constata: anizocitoza, poikilocitoza, eritrocite nucleate.

Eritrocitele se dispun în fișicuri. Această dispoziție nu apare în unele stări patologice cum este icterul hemolitic congenital și uneori în anemii hemolitice cu autoanticorpi, datorită sferocitozei sau aglutinării eritrocitelor. Așezarea în fișicuri nu trebuie confundată cu aglutinarea.

În cazul aglutinării eritrocitelor, datorită intervenției izoanticorpilor sau autoanticorpilor acestea se dispun în formă de ciorchine. Dacă sîngele se recoltează cu ser fiziologic, așezarea în fișicuri nu se mai produce, spre deosebire de aglutinarea prin intervenția anticorpilor, care nu este influențată de serul fiziologic. În caz de aglutinare se poate observa „fenomenul firului"; apare o substanță filamentoasă, care leagă eritrocitele între ele, iar eritrocitele tracționate de curent iau un aspect fuziform.

După cîteva ore de ședere între lamă și lamelă, multe din eritrocite își pierd forma lor normală și iau aspectul unei sfere cu suprafața netedă sau neregulată (eritrocite muriforme sau „în arici").

Examenul între lamă și lamelă al sîngelui proaspăt se mai folosește pentru cercetarea eritrocitelor falciforme. Tehnica detaliată este expusă în capitolul respectiv.

Leucocitele se disting prin mărimea lor și prin prezența granulațiilor, care se prezintă incolore, ca niște puncte refringente. Se pot deosebi ușor polimorfonuclearele de limfocite și monocite, prin forma nucleului, care este bine vizibil.

NUMĂRĂTOAREA ERITROCITELOR

Principiu. Numărătoarea celulelor sîngelui sau a altor lichide biologice se bazează pe numărătoarea directă, la microscop, a celulelor obținute într-un volum cunoscut de lichid, diluate într-o proporție cunoscută.

Diluția sîngelui este necesară pentru a putea număra elementele figurate, care sînt foarte numeroase, și pentru ca sîngele să nu coaguleze.

Material necesar:
— Lichidul de diluție.
— Pipetă pentru eritrocite.
— Cameră de numărătoare.
— Microscop.
— Ace pentru puncție, alcool, eter, vată.

Lichide de diluție:

— *Lichidul Hayem*

Clorură de sodiu	1 g
Sulfat de sodiu	5 g
Sublimat	0,5 g
Apă distilată	200 ml

Soluţia se filtrează prin hîrtia de filtru

— *Lichidul Withby*

Clorură de sodiu	0,6 g
Citrat de sodiu	1 g
Formol 40%	1 ml
Apă distilată	99 ml

Se poate folosi ca lichid de diluţie şi *serul fiziologic.*

Pipeta pentru diluţia eritrocitelor se compune dintr-un tub capilar gradat şi o bulă de diluţie cu o perlă mobilă (fig. 127). Tubul capilar este gradat şi se citesc pe el notaţiile 0,5 şi 1, iar spaţiul dintre ele este divizat în 10 segmente egale. Deasupra bulei de diluţie este notaţia 101. Dacă sîngele este tras în tubul capilar pînă la diviziunea 0,5 sau 1 şi apoi completat cu lichidul de diluţie pînă la notaţia 101, se obţine o diluţie a sîngelui de 1/200 sau, respectiv, 1/100. Partea de sus a pipetei se adaptează la un tub de cauciuc, care permite o aspiraţie uniformă. Capacitatea totală a pipetei este de 101 volume, dar diluţia este de 1/100 şi 1/200, datorită faptului că un volum de diluant rămîne în tubul capilar şi nu diluează sîngele.

După întrebuinţare pipetele se spală cu apă, apoi cu alcool şi eter, se usucă, se sterilizează la căldură uscată.

Deşi pipeta de diluţie pentru numărătoarea eritrocitelor este folosită de toată lumea şi impusă în practică, totuşi metoda este supusă multor critici : amestecul duce la erori de diluţie datorită cantităţii foarte mici de sînge folosit pentru diluţie.

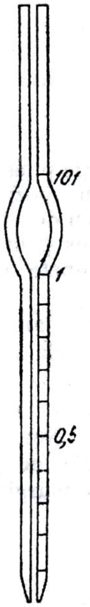


Fig. 127. — Pipetă pentru eritrocite.

Dacie recomandă utilizarea pipetei de hemoglobină, care permite recoltarea a 0,02 ml sînge. Această cantitate se diluează 1/200 într-o eprubetă care conţine 4 ml din soluţia următoare :

Formol	1 ml
Citrat de sodiu 3%	99 ml

Camere de numărătoare pentru eritrocite. Orice cameră de numărătoare are gravate pe ea următoarele date :

— înălţimea camerei, care este de 0,100 mm (1/10 mm);

— două cifre : 1/400 şi 1/25 sau : 1/400 şi 1/16, cifre care variază după celulă şi indică a cîta parte dintr-un milimetru pătrat este pătrăţelul mic şi pătrăţelul mare, care nu au subdiviziuni.

Camera Thoma. Cadrilajul lamei Thoma are latura de 1 mm şi suprafaţa de 1 mm pătrat. Această suprafaţă este divizată în 400 de pătrăţele, suprafaţa unui pătrăţel fiind de 1/400 mm^2. Pe suprafaţa de 1 mm^2 sînt delimitate 16 pătrate mari, prin linii triple (fig. 128).

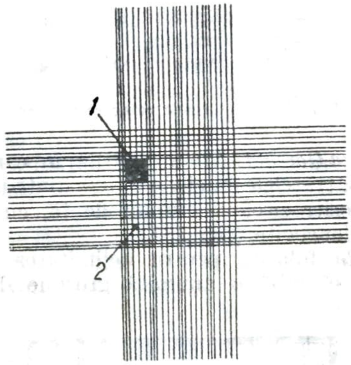


Fig. 128. — Reţeaua camerei Thoma : *1* — pătrat mare 1/25 ; *2* — pătrat mic 1/400.

Camera Bürker. Are o suprafaţă de 9 mm^2, împărţită în 9 pătrate de cîte 1 mm^2, delimitate prin linii triple. Fiecare milimetru pătrat este subîmpărţit prin linii duble în 16 pătrate (fig. 129). La întretăierea liniilor duble se înscriu pătrate mici, care reprezintă 1/400 dintr-un milimetru pătrat ; acestea pot fi folosite pentru numărătoarea eritrocitelor.

Camera Bürker-Türck. Are o suprafaţă de 9 mm^2 şi reţeaua sa este gravată după tipul Türck, combinat cu tipul Thoma. Suprafaţa de 9 mm^2 este mărginită pe toate laturile de o triplă linie şi este împărţită în 9 pătrăţele de 1 mm^2 prin linii triple. Pătratul din mijloc, de 1 mm^2, este de tipul Thoma, fiind împărţit în 400 de pătrăţele mici : 1/400 dintr-un mm^2, care se foloseşte pentru numărătoarea eritrocitelor. Pătratele inferioare şi superioare, laterale drepte şi stîngi sînt împărţite în 16 pătrăţele, separate între ele prin linii duble (fig. 130). Un astfel de pătrăţel are o suprafaţă de 1/25 dintr-un mm², adică o suprafaţă egală cu 16 pătrăţele mici a 1/400 mm². Aceste suprafeţe se folosesc pentru numărarea globulelor albe.

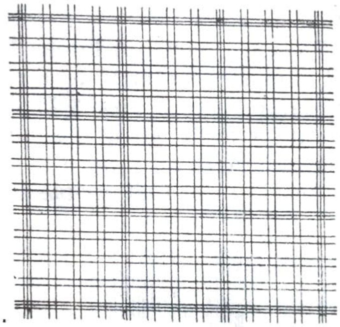


Fig. 129. — Reţeaua camerei Bürker.

Camera Goreaev. Are un cadrilaj în care alternează pătrăţelele mici de 1/400 dintr-un mm², pentru eritrocite, în grupuri de 16, cu pătrate pentru leucocite (fig. 131).

Lamela folosită pentru delimitarea camerei trebuie să aibă o anumită grosime de aproximativ 0,3—0,5 mm, fiind perfect plană şi şlefuită (fig. 132).

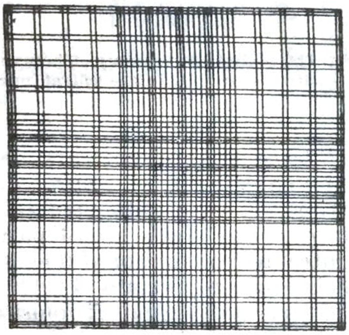


Fig. 130. — Reţeaua camerei Bürker-Türck.

Microscop: se lucrează cu obiectiv uscat mare 40, ocular 10 sau 7, lumină slabă.

Tehnica de numărătoare. Recoltarea sîngelui. După înţeparea pulpei degetului, prima picătură se şterge, iar a doua se aspiră în pipetă pînă la diviziunea 0,5 sau 1, citirea făcîndu-se cu pipeta în poziţie verticală. Dacă sîngele depăşeşte uşor diviziunea, prin atingerea vîrfului pipetei cu o hîrtie de filtru şi, la nevoie, cu pulpa degetului, coloana de sînge se poate potrivi exact pînă la diviziunea dorită. Se aspiră apoi lichidul de diluţie pînă la diviziunea 101. Pipeta se aşază în poziţie orizontală, se astupă cele două capete cu degetul mare şi cel mijlociu şi se agită viguros pentru omogenizare. Pînă la numărătoare pipeta rămîne în poziţie orizontală.

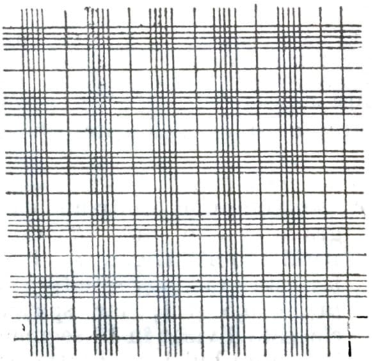


Fig. 131. — Reţeaua camerei Goreaev.

Umplerea camerei de numărat. Se aplică lamela pe lama celulei de numărat, fie prin simplă adeziune, fie cu ajutorul cavalerilor. Este necesară o bună aderenţă între lamă şi lamelă, care este asigurată cînd se formează inelele Newton (inele colorate de refracţie). Dacă celula nu are cavaleri lamela se va umezi uşor la margini, aburind-o, şi astfel aderă bine.

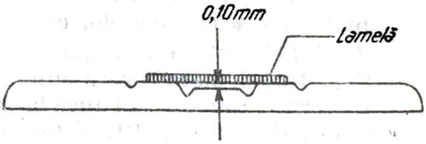


Fig. 132. — Profilul unei camere de numărat.

Se agită pipeta timp de 2—3 minute, apoi primele picături care se scurg sînt lăsate să cadă pe o hîrtie de filtru. Vîrful pipetei se apropie de marginea camerei acoperită cu lamela şi se lasă să intre, prin capilaritate, în cameră, o cantitate de lichid, în spaţiul de 1/10 mm format între lamă şi lamelă.

Este de dorit ca să se introducă dintr-o dată atîta lichid, încît spaţiul dintre lamă şi lamelă să fie umplut în întregime, fără ca lichidul să treacă în şanţurile laterale, fără ca lamela să se deplaseze, fără să intre bule de aer în cameră; în caz contrar, operaţia se repetă după ştergerea camerei. Se aşteaptă cîteva minute pentru sedimentarea elementelor pe cadrilaj.

Numărătoarea eritrocitelor. Se examinează camera la microscop şi se numără elementele ce se găsesc pe cadrilaj în pătrăţelele mici de 1/400 mm^2. Se numără, de exemplu, 5 pătrate de dimensiunea 1/25, conţinînd fiecare cîte 16 pătrăţele de 1/400 mm^2, deci în total 80 de pătrăţele mici de 1/400 mm^2. Pentru a nu număra de două ori acelaşi eritrocit, elementele situate pe intersecţii se numără numai pe două laturi, de exemplu sus şi stînga.

Dacă în 80 de pătrăţele găsim 450 de eritrocite, în 400 pătrăţele, adică 1 mm^2 există: $\frac{450 \times 400}{80}$ sau 450×5, cifră care se înmulţeşte cu diluţia şi cu înălţimea camerei.

Dacă diluţia este de 1/200, înălţimea fiind 1/10, se va înmulţi cu 200 şi respectiv 10, adică cu 2 000:

$$450 \times 5 \times 2\,000 = 4\,500\,000$$

sau, mai simplu: cînd diluţia este de 1/200, cifra de eritrocite găsită pe 80 de pătrăţele se înmulţeşte cu 10 000 şi aflăm numărul de eritrocite pe mm^3.

Cînd diluţia este de 1/100, cifra de eritrocite găsită pe 80 de pătrăţele se înmulţeşte cu 5 000.

Rezultate normale pentru eritrocite:

- bărbat = 4 500 000–5 000 000 pe mm^3;
- femeie = 4 200 000–4 500 000 pe mm^3;
- nou-născut = 5 000 000–6 000 000 pe mm^3.

Erori în numărătoarea elementelor sanguine. Erori datorite aparatelor. Aceste erori se datoresc unei etalonări greşite a pipetelor de diluţie, a camerei de numărătoare: a cadrilajului sau a înălţimii camerei. De asemenea, o lamelă de acoperire fără o suprafaţă perfect plană sau o spălare defectuoasă a materialului pot fi cauze de erori.

Erorile datorite tehnicii sînt legate de felul recoltării sîngelui: înţepătură superficială sau în regiuni puţin vascularizate; stoarcerea degetului, ceea ce duce la diluţia sîngelui; evaporarea, coagularea sau sedimentarea probei de cercetat; erori de pipetare şi diluare. Erori mai pot surveni datorită intrării de bule de aer în pipetă, sau unei suspensii neomogene prin agitare insuficientă, ori prin aglutinare patologică a elementelor celulare (autoanticorpi).

Erori datorite examinatorului. Modul diferit de numărătoare pe cadrilaj, lipsa de atenţie sau oboseala după multe examene pot duce la erori. Utilizarea microfotografierii celulei de numărat evită oboseala oculară şi imobilizarea îndelungată la microscop.

Introducerea unei cantităţi prea mici de lichid, care nu acoperă toată lama, sau a unei cantităţi prea mari, care produce un curent de lichid înspre şanţurile laterale, trebuie evitată. Prezenţa de bule în cameră face imposibilă numărătoarea.

Erori inerente metodei. Distribuţia neregulată a elementelor pe suprafaţa cadrilajului dă variaţii care sînt cu atît mai mici, cu cît numărul de elemente numărate este mai mare.

În mod obişnuit numărătoarea de eritrocite nu este jenată de leucocite, acestea fiind puţine la număr. În caz de leucocitoze puternice (leucoze) se va căuta să se identifice elementele albe, pentru a nu fi înglobate în numărătoare.

La numărătoarea leucocitelor pot surveni erori mari cînd în sîngele periferic există eritroblaşti. În astfel de cazuri se determină cifra absolută de eritroblaşti pe mm^3 şi aceasta se scade din numărul total de elemente nucleate, pentru a afla cifra reală a leucocitelor, în funcţie de raportul elementelor stabilit în formula leucocitară. Pentru numărătoarea de eritrocite, erorile admise în lucrul curent de laborator sînt de 100 000–200 000 între două numărători făcute cu acelaşi sînge.

Pentru numărătoarea de leucocite erorile admise sînt de 100–200 de elemente pe mm^3, între două numărători făcute cu acelaşi sînge, cînd numărul de leucocite este normal.

DOZAREA HEMOGLOBINEI

Principiu. Se compară colorimetric o soluţie de clorhidrat de hematină obţinută din sîngele de cercetat, cu un etalon stabilit după cantitatea normală de hemoglobină, care este de 16 g/100 ml sînge.

Material necesar:

- Hemoglobinometru Sahli.
- Pipetă capilară de capacitate 20 mm^3.
- Pipetă Pasteur.
- Baghetă de sticlă pentru amestecat.
- Material necesar pentru înţepătură.
- Acid clorhidric N/10.

Hemoglobinometrul Sahli este format dintr-un tub gradat special pentru dozarea hemoglobinei.

Tubul are două gradații, una în grame la 100 ml sînge, alta în procente față de normal: 16 g corespund la 100% hemoglobină, 8 g corespund la 50% hemoglobină etc.

Tubul gradat este montat într-un comparator, între două prisme etalon sau două baghete de sticlă etalon, colorate (fig. 133).

Este corect ca înainte de a intra în uz, orice hemoglobinometru nou să fie etalonat cu o determinare fotometrică a hemoglobinei, pentru a face corecția corespunzătoare.

Tehnica. Se pune în tubul gradat acid clorhidric N/10 pînă la diviziunea 10. Se recoltează sîngele în pipeta de hemoglobină (fig. 134) pînă la diviziunea unică a pipetei (20 mm³). Se șterge exteriorul pipetei. Se introduce vîrful pipetei în fundul tubului gradat și se suflă sîngele din pipetă în plin lichid (ClH N/10).

Se clătește pipeta pentru spălare de 2—3 ori cu acidul clorhidric din tub. Se scoate pipeta din tub. Se agită tubul pentru a omogeniza amestecul. Se așteaptă 5 minute, în care timp amestecul se închide la culoare; se formează clorhidratul de hematină, de culoare brună.

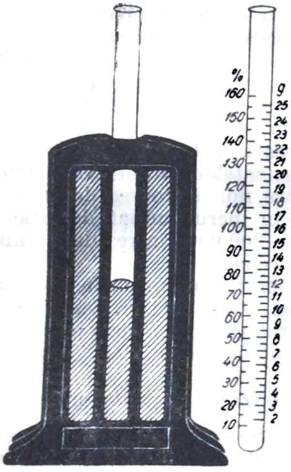


Fig. 133. — Hemoglobinometrul Sahli și tubul său gradat. Tubul are două scări: unități procentuale și grame de hemoglobină la 100 ml sînge; 100% corespunde la 16 g Hb la 100 ml sînge.

Se adaugă apoi apă distilată cu picătura, amestecînd cu bagheta de sticlă. În același timp tubul se compară cu nuanța etalon a prismei din comparator. Cînd nuanța tubului ajunge egală cu nuanța etalonului, se citește gradația de pe tub la nivelul meniscului inferior al lichidului.

Rezultatele se pot exprima în grame de hemoglobină la 100 ml sînge sau în procente față de normal. Dacă tubul are o singură indicație, se poate transforma rezultatul printr-o regulă de trei simplă, știind că 16 g reprezintă 100% și invers.

Erori în dozarea hemoglobinei. Metoda în sine nu prezintă sensibilitate mare, nu este deci cea mai precisă, căci aprecierea se face cu ochiul liber. Totuși, bine executată și cu un aparat etalonat precis, aduce servicii mari în clinică, fiind rapidă și simplă.

Erori datorite materialului: pipete știrbite, aparat neprecis etalonat.

Erori de execuție: sînge rămas pe partea externă a pipetei, amestec neomogen al sîngelui cu acidul clorhidric. Acest amestec trebuie să se facă imediat după recoltare și agitat imediat după îndepărtarea pipetei.

Erori de diluție: cînd adaosul de apă depășește nuanța etalonului; cînd apa distilată se adaugă înainte de 5 minute de contact al sîngelui cu acidul clorhidric. Cînd hemoglobina bolnavului este mult scăzută — sub 20% — dacă se pune din greșeală acid clorhidric pînă la diviziunea 20 nu se poate realiza egalarea nuanțelor; la fel, dacă hemoglobina este sub 10%.

Fig. 134. — Pipeta de hemoglobină.

Citirea la hemoglobinometru trebuie să se facă la lumina zilei; lumina artificială de erori.

Valorile exprimate în procente față de normal nu sînt corecte, avînd în vedere variațiile mari fiziologice, normalul fiind luat 100% în mod arbitrar. Este preferabilă exprimarea în grame la 100 ml de sînge, prin dozare fotometrică.

Dozarea fotometrică a hemoglobinei

Material necesar:

— Fotometru.
— Hemoglobină pură pentru etalonare.
— Amoniac soluție 0,4%.
— Hiposulfit de sodiu cristale.
— Pipetă de hemoglobină de 20 mm³.
— Pipetă gradată de 1 ml.

Prepararea hemoglobinei pentru curba etalon. În lipsă de hemoglobină pentru curba etalon, noi recomandăm următorul procedeu pentru prepararea hemoglobinei :

Sîngele uman se recoltează pe anticoagulant și se spală eritrocitele pînă cînd se îndepărtează complet proteinele plasmatice. Se tratează 5 ml din eritrocitele spălate cu 7,5 ml apă distilată și 2 ml toluen, într-o eprubetă de centrifugă închisă cu dop de cauciuc. Se agită foarte puternic și continuu timp de 5—6 minute, apoi se centrifughează timp de 20 de minute la 3 000 sau 5 000 ture/minut. Se decantează soluția de hemoglobină astfel obținută și se centrifughează din nou, în condiții identice. Se pune apoi în sac de celofan și la dializă : timp de 48 de ore față de apă de robinet și 24 de ore față de apă distilată. Sacul de celofan se va lega strîns, pentru a nu permite o diluare prea mare.

După dializă se pun 5 ml din soluția de hemoglobină într-o sticlă de ceasornic cu greutatea cunoscută și apoi se pune totul într-o etuvă de vid, în prezența unor desicanți cum sînt clorura de calciu sau pentoxidul de fosfor. Se face vid treptat, pentru ca soluția să nu fiarbă ; cînd soluția este suficient de uscată, se ridică temperatura etuvei la 100° și se lasă timp de circa 24 de ore, cîntărindu-se de 3—4 ori, pînă cînd ponderea rămîne constantă.

Cunoscînd reziduul uscat din 5 ml al soluției de hemoglobină, se face o soluție-mamă de hemoglobină de 1%, într-un balon cotat.

Din soluția-mamă de 1% hemoglobină se fac concentrații diferite de hemoglobină în apă amoniacală 0,4% : 0,01 g%, 0,02 g%, 0,03 g%, pînă la 0,1 g%. Se adaugă apoi în fiecare soluție un vîrf de cuțit de hiposulfit de sodiu și se stabilesc, la fotometru, extincțiile pentru fiecare diluție.

Se poate înscrie o dreaptă care să reprezinte concentrațiile în funcție de extincție sau se calculează factorul curbei respective :

$$X = \frac{C}{E}$$

în care :

C = concentrația, iar E = extincția

O dată stabilit factorul X, se poate afla C cunoscînd extincția E.

Tehnica dozării. După înțeparea pulpei degetului se recoltează cu o pipetă de hemoglobină 20 mm^3 sînge, care se adaugă la 2 ml apă amoniacală din care s-au sustras, în prealabil, cu o pipetă de hemoglobină, 20 mm^3. Se spală pipeta de hemoglobină în apa amoniacală, se agită, se adaugă cîteva cristale de hiposulfit de sodiu, se fotometrează în cuvă de 5 mm grosime, folosind filtrul S_{57}. Cuva de compensație se umple cu apă distilată.

Cunoscînd extincția și factorul de etalonare stabilit prin curbă, se poate calcula concentrația hemoglobinei, care se va înmulți cu 100, avînd în vedere diluția inițială.

Exprimarea rezultatelor. Rezultatele trebuie să fie exprimate în grame de hemoglobină la 100 ml sînge.

Valori normale : pentru bărbat între 14 și 18 g%, pentru femeie între 12 și 16 g%.

TABELUL 65

Variațiile fiziologice ale hemoglobinei în grame la 100 ml sînge venos (J. Bernard)

Vîrsta	Cifră medie	Limite normale
Nou-născut	21,5	18,0—27,0
Prima zi	21,2	17,7—26,5
Prima săptămînă (sfîrșit)	19,6	16,2—25,5
a 2-a ,, ,,	18,0	14,5—24,2
a 3-a ,, ,,	16,6	13,2—23,0
a 4-a ,, ,,	15,6	12,0—21,8
a 2-a lună ,,	13,3	10,8—18,0
a 4-a ,, ,,	12,4	10,2—15,0
a 6-a ,, ,,	12,3	10,0—15,0
a 8-a ,, ,,	12,1	9,8—15,0
a 10-a ,, ,,	11,9	8,4—14,9
a 12-a ,, ,,	11,6	9,0—14,6
al 2-lea an ,,	11,7	9,2—15,5
al 4-lea ,, ,,	12,6	9,6—15,5
al 6-lea ,, ,,	12,7	10,0—15,5
al 8-lea ,, ,,	12,9	10,3—15,5
9—13 ani	13,1	10,8—15,4
Adulți (bărbați și femei)	14,35	12,0—17,0
Bărbați	15,4	13,6—17,2
Femei	13,3	11,5—15,0

Determinarea hemoglobinei totale circulante

Această determinare este singura valabilă cînd există modificări ale volumului plasmatic. Dacă masa plasmatică și masa eritrocitară sînt simultan diminuate, există o anemie adevărată, cu toate că dozarea hemoglobinei dă cifre normale. Invers, o falsă anemie poate fi rezultatul unei creșteri izolate a volumului plasmatic.

Determinarea hemoglobinei totale circulante necesită calcularea volumului sanguin.

TEHNICI PENTRU DETERMINAREA DIFERITELOR TIPURI DE HEMOGLOBINE

Determinarea hemoglobinei alcalinorezistente

Material necesar:

— Anticoagulant pentru recoltarea sîngelui: oxalat de sodiu, citrat de sodiu, heparină, amestec Wintrobe.

— NaOH sau KOH N/12.

— Toluen.

— Reactiv precipitant:

Soluţie saturată de $SO_4(NH_4)_2$	100 ml
ClH 10N	0,5 ml
Apă distilată	100 ml

Tehnica. Pentru prepararea soluţiei de hemoglobină sîngele se recoltează pe anticoagulant şi se spală eritrocitele pînă cînd se îndepărtează complet proteinele plasmatice. 1 ml eritrocite spălate se tratează cu 1,5 ml apă distilată şi 0,4 ml toluen într-o eprubetă de centrifugă închisă cu dop de cauciuc. Se agită foarte puternic şi continuu timp de 5—6 minute, apoi se centrifughează timp de 20 de minute la 3 000 — 5 000 ture/minut. Se decantează soluţia de hemoglobină astfel obţinută şi se centrifughează din nou în condiţii identice.

Se adaugă 0,1 ml soluţie de hemoglobină la 1,6 ml NaOH N/12. Se spală de 5—6 ori pipeta în soluţie alcalină şi se agită uşor. Exact după 1 minut se adaugă 3,4 ml reactiv precipitant, se amestecă uşor şi apoi se filtrează sau se centrifughează. Lichidul supernatant (soluţia A) este fotocolorimetrat.

Se prepară soluţia B adăugînd 0,02 ml soluţie de hemoglobină la 4 ml apă distilată şi se fotocolorimetrează. Pentru a măsura 0,02 ml se foloseşte o pipetă de hemoglobină.

Determinarea procentuală a hemoglobinei alcalinorezistente se face după formula:

$$\text{Hemoglobină A.R. } \% = \frac{\text{Extincţie sol. A} \times 1/4}{\text{Extincţie sol. B.}} \times 100$$

Studiul solubilităţii

Se studiază solubilitatea hemoglobinei reduse într-un amestec de două soluţii-tampon fosfaţi de concentraţie 2,24 M şi 2,58 M. În tamponul de concentraţie 2,24 M numai hemoglobina S nu este în totalitate solubilă; celelalte hemoglobine sînt solubile. În tamponul de concentraţie 2,58 M solubilitatea celorlalte hemoglobine variază după natura hemoglobinei şi după hemoglobina cu care sînt asociate.

Reactivi necesari:

— Hidrosulfit de sodiu.

— Soluţie tampon 2,8 M.

Fosfat bipotasic: 1,62 M (282 g la litru).

Fosfat monopotasic: 1,18 M (160 g la litru).

Tehnica. Se va lucra la temperatura de 25° ± 1°.

Solubilitatea în tamponul 2,24 M. Într-un balon cotat, cu capacitatea de 10 ml, se introduc 100 mg hidrosulfit de sodiu. Se adaugă 8 ml tampon 2,8 M şi se agită pînă la dizolvarea hidrosulfitului. Se adaugă uşor, pe suprafaţa lichidului, o cantitate de soluţie de hemoglobină conţinînd exact 50 mg de hemoglobină (se foloseşte soluţia de hemoglobină, care se prepară după tehnica pentru studiul hemoglobinei alcalinorezistente. Această soluţie de hemoglobină se titrează fotometric, pentru a afla concentraţia). Se completează cu apă pînă la 10 ml. În balonul cotat există o concentraţie de hemoglobină de 5 g la litru. Se amestecă, se filtrează şi se dozează hemoglobina în filtrat.

Solubilitatea în tamponul 2,58 M. Se procedează la fel ca mai sus, cu singura deosebire că în balonul cotat de 10 ml se adaugă 9,2 ml tampon 2,8 M în loc de 8 ml.

Rezultate. În *tamponul 2,24 M*, formarea unui precipitat arată prezenţa hemoglobinei S în proba de cercetat. Celelalte hemoglobine sînt solubile în acest tampon. Citirea fotometrică a filtratului dă concentraţii care variază cu natura şi cantitatea de hemoglobină care însoţeşte hemoglobina S:

— drepanocitoza SS = 0,10 g pînă la 0,95 g ‰;

— drepanocitoza AS = 1,25 g pînă la 2,20 g ‰;

— hemoglobinoză SD = idem;

— hemoglobinoză SC = 0,90 g pînă la 1,20 g ‰;

— hemoglobinoză SAF = variabilă, mai solubilă decît SS.

În proba cu *tamponul 2,58 M* apare în mod constant un precipitat care se datoreşte celorlalte hemoglobine; absenţa de precipitat în primul tampon arată absenţa hemoglobinei S. Citirea fotometrică a filtratului arată următoarele concentraţii:

— hemoglobină de adult normală AA = = 1,50 g ‰;

— hemoglobinoză DD sau AD = idem;

— hemoglobinoză CC = 3,5 g ‰;

— hemoglobinoză AC = 1,75 g pînă la 2,10 g ‰;

— talasemia: variază în funcție de concentrația hemoglobinei F.

Methemoglobina se comportă foarte diferit; de aceea se vor folosi probe care nu au fost supuse la agenți methemoglobinizanți.

Cercetarea eritrocitelor falciforme

Se aplică la baza degetului un garou timp de 10 minute și înainte de ridicarea garoului se recoltează o picătură de sînge, care se depune între lamă și lamelă. Se parafinează lamela cît mai riguros. Se face o citire imediată, apoi se pune la termostat la 37° și se fac citiri la 1 oră, la 12, la 24 și 38 de ore. Testul este pozitiv dacă la una din aceste citiri se găsește o proporție de eritrocite falciforme de cel puțin 50%.

Proba cu agenți reductori. Se amestecă 1 picătură de sînge cu 1 picătură de soluție de cisteină 2%, sau cu soluție de bisulfit de sodiu 2%. Se aplică o lamelă și se parafinează. Se pune lama în termostat la 37° și se citește după 15 minute și după 1 oră.

HEMATOCRITUL

(Determinarea volumului eritrocitar)

Principiu. Prin centrifugare se separă eritrocitele de plasmă și se evaluează raportul cantitativ între ele.

Material necesar:

— Hematocrit.

— Centrifugă.

— Anticoagulant.

— Material necesar pentru recoltarea sîngelui prin puncție venoasă.

Tehnică. Hematocritul este un tub gradat care se poate adapta la o centrifugă și permite, după centrifugare, citirea înălțimii coloanei de eritrocite și exprimarea procentuală față de coloana de sînge. Este necesar ca tubul de hematocrit să aibă o gradație precisă și să fie din sticlă groasă, pentru a rezista centrifugării. Se pot confecționa tuburi de hematocrit din pipete de viteză de sedimentare.

Anticoagulantul. Se folosește heparina: 1 picătură de heparină standard, folosită în terapeutică, este suficientă pentru 5 ml sînge. Se mai poate folosi amestecul anticoagulant Wintrobe, în condițiile descrise la „recoltarea sîngelui".

Condițiile de centrifugare. Pentru o sedimentare maximă a eritrocitelor este necesară o centrifugare de 20 de minute la 4 000 ture/minut, cu tuburile în poziție orizontală. În caz de centrifugă fără indicator de turații se stabilesc condițiile de centrifugare maximă și de timp pînă cînd volumul eritrocitar din tub nu mai scade.

Calcul. După centrifugare se măsoară înălțimea *h* a coloanei de eritrocite și înălțimea *H* a coloanei totale a sîngelui. Dacă tubul de hematocrit este gradat în diviziuni de milimetri, se face citirea direct. Dacă tubul nu are diviziuni, se poate face citirea coloanelor cu ajutorul unei linii sau al unei hîrtii milimetrice. Coloana *H* reprezintă 100%; în acest caz înălțimea *h* a coloanei de eritrocite reprezintă

$$h\ \% = \frac{100 \times h}{H}$$

De exemplu, dacă *H* este egal cu 50 de diviziuni și *h* măsoară 20 de diviziuni, hematocritul este de $\frac{100 \times 20}{50} = 40\ \%$. Deci, din 100 ml sînge 40 ml sînt reprezentate de eritrocite și 60 ml de plasmă.

Valorile normale sînt:

— la bărbați în medie 44,9%, cu limite normale între 39% și 51%;

— la femei în medie 40,7%, cu limite normale între 35,3% și 49%.

Corecții. Cifra de hematocrit astfel obținută corespunde teoretic sumei volumului tuturor eritrocitelor conținute în 100 ml sînge, iar diferența de la 100 ml indică cantitatea corespunzătoare de plasmă. La această cifră se fac următoarele corecții:

— Plasma interstițială: chiar după o centrifugare completă, eritrocitele nu se adaptează exact unele peste altele și rămîne între ele un spațiu cu plasmă interstițială reținută. Această plasmă interstițială este socotită ca fiind de 5% din volumul eritrocitar total. Dacă la un hematocrit de 40% se scade această cifră de corecție, hematocritul devine 38%.

— Stratul leucocitar-trombocitar: în mod normal acest strat este neglijat fiind mai mic de 1%. În leucocitoze puternice, în leucoze de exemplu, acest strat crește considerabil și trebuie măsurat pentru a aprecia corect atît stratul eritrocitar, cît și cel plasmatic.

— Rezultatele normale menționate mai sus, cu corectările necesare, reprezintă hematocritul sîngelui venos. Hematocritul arterial și mai ales cel capilar sînt mai scăzute. Atunci cînd se determină volumul sîngelui total se corectează cifra hematocritului venos măsurat, pentru a afla hematocritul somatic, care este cel valabil în această determinare: hematocrit somatic = 0,864 × hematocrit venos măsurat.

Variaţii patologice:

— Hematocrit ridicat: pletoră eritrocitară şi plasmatică (pletoră sanguină), plasmoragie.

— Hematocrit scăzut: anemie cu volemie normală, hidremie.

— Hematocrit normal: hemoragii acute înainte de refacerea plasmatică.

DETERMINAREA HEMATOCRITULUI, HEMOGLOBINEI ŞI A PROTEINEMIEI PRIN METODA DENSIMETRICĂ (PHILLIPS—VAN SLYKE)

Metoda densimetrică sau metoda de orientare pentru dozarea proteinelor plasmatice este o metodă simplă, uşor de executat şi foarte rapidă.

Metoda este inutilizabilă în nefroze lipoidice, din cauza dezechilibrului existent între proteine şi lipide.

Principiu. Densitatea sîngelui este în funcţie de hematocrit şi de concentraţia în proteine, iar densitatea plasmei este în funcţie numai de concentraţia în proteine.

Determinarea densităţii sîngelui total şi a plasmei în metoda densimetrică se face comparativ cu o serie de soluţii de sulfat de cupru cu densităţi cunoscute.

Reactivi necesari:

— Anticoagulanţi: heparină (10 u. pentru 1 ml sînge) sau amestec Wintrobe (1,2 g oxalat de amoniu + 0,8 g oxalat de potasiu în 100 ml apă); 1 ml amestec Wintrobe este suficient pentru a face incoagulabili 9 ml sînge.

— Soluţie-mamă de SO_4Cu cu 5 H_2O (170 g SO_4Cu cu 5 H_2O p.a. sînt dizolvate în 1 000 ml apă distilată), cu densitate de 1 100. Soluţiile etalon de sulfat de cupru se obţin conform tabelului 66.

Soluţia etalon se pune în eprubete mari sau sticle de penicilină şi se astupă, pentru a nu se evapora. 100 ml lichid sînt utilizaţi pentru 100 de picături de sînge sau plasmă. Peste această cifră se schimbă concentraţia lichidului.

Tehnică. Pentru determinarea densităţii sîngelui total nu este nevoie de anticoagulant, cu condiţia ca determinarea să se facă imediat după recoltare.

TABELUL 66

Densitatea	Sol. SO_4 Cu densitate 1 100 (ml)	Apă distilată (ml)
1 016	7,62	pînă la 50
1 018	8,62	,, ,,
1 020	9,61	,, ,,
1 022	10,60	,, ,,
1 024	11,58	,, ,,
1 026	12,56	,, ,,
1 028	13,56	,, ,,
1 030	14,52	,, ,,
1 032	15,60	,, ,,
1 034	16,50	,, ,,
1 036	17,50	,, ,,
1 038	18,50	,, ,,
1 040	19,50	,, ,,
1 042	20,50	,, ,,
1 044	21,50	,, ,,
1 046	22,50	,, ,,
1 048	23,50	,, ,,
1 050	24,50	,, ,,
1 052	25,50	,, ,,
1 054	26,50	,, ,,
1 056	27,50	,, ,,
1 058	28,50	,, ,,
1 060	29,50	,, ,,
1 062	30,50	,, ,,
1 064	31,50	,, ,,
1 066	32,50	,, ,,
1 068	33,50	,, ,,
1 070	34,50	,, ,,

Pentru determinarea densităţii plasmei se poate utiliza heparină praf în concentraţii de 1 mg pentru 10 ml sînge sau amestec Wintrobe.

Din amestecul Wintrobe se repartizează cîte 0,5 ml în fiecare eprubetă şi se lasă eprubetele cu soluţie să se usuce 3—4 zile, la 37°. Pe substanţa uscată se recoltează 5 ml sînge. În cazul folosirii acestui amestec se face corecţia densităţii, scăzînd 0,0008 din densitatea găsită.

Cu o pipetă efilată se lasă să cadă o picătură de sînge sau plasmă la 1 cm înălţime deasupra soluţiei de sulfat de cupru cu densitate corespunzătoare densităţii normale:

pentru sînge	1 057
pentru plasmă	1 026

Picătura se comportă în trei feluri:

— Dacă picătura de sînge sau plasmă se ridică la suprafaţa lichidului înseamnă că densitatea picăturii este mai mică decît densitatea soluţiei.

— Dacă picătura de sînge sau plasmă coboară la fundul vasului înseamnă că densitatea picăturii este mai mare decît a soluţiei.

— Dacă picătura pluteşte în interiorul soluţiei înseamnă că densitatea sîngelui sau a plasmei este aceeaşi cu densitatea soluţiei.

Prin tatonare se găsește soluția corespunzătoare, la care picătura de sînge sau plasmă rămîne cîteva secunde în echilibru, imobilă. În mod practic se începe cu determinarea sîngelui total, ale cărui valori normale sînt cuprinse între 1 052 și 1 062. În aceleași condiții se determină densitatea plasmei. Valorile normale pentru densitatea plasmei sînt cuprinse între 1 025 și 1 028.

Valorile normale se notează pe scara respectivă din grafic și se unesc printr-o dreaptă valorile găsite la sînge și plasmă.

Valorile densității găsite pentru plasmă și sînge se raportează la graficul din fig. 135.

Unind cele două puncte printr-o dreaptă se poate citi :

Proteinemia în g $^{0}/_{00}$
Hemoglobina în g% ml
Hematocritul (volumul eritrocitar)

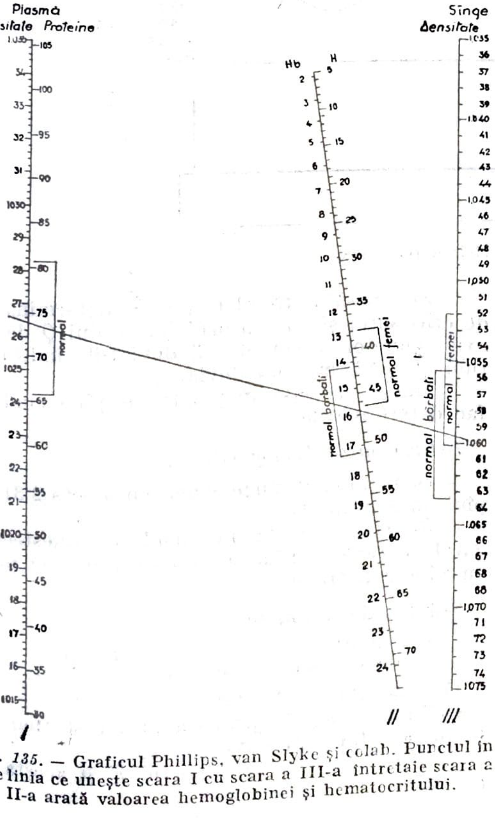


Fig. 135. — Graficul Phillips, van Slyke și colab. Punctul în care linia ce unește scara I cu scara a III-a intretaie scara a II-a arată valoarea hemoglobinei și hematocritului.

Exemplu : pentru densitatea plasmei de 1 026 și pentru densitatea sîngelui 1 060 corespund valorile următoare : proteinemia = 74 g $^{0}/_{00}$; hematocrit = 47 %, hemoglobină = 16 %.

Metoda permite determinarea proteinemiei și hemoglobinei, cu erori foarte mici. Determinarea volumului hematiilor se face însă cu o eroare de 4 ori mai mare decît a hemoglobinei.

Ureea și glicemia mult crescute pot mări densitatea sîngelui total și falsifică valoarea proteinemiei. Lipemia scade densitatea.

DETERMINAREA NUMĂRULUI DE ERITROCITE ȘI A HEMOGLOBINEI CU AJUTORUL ELECTROHEMOSCOPULUI (HELLIGE 662/GA)

Pentru determinări în serie se folosește electrohemoscopul, care permite citirea directă a numărului de eritrocite și a proporției de hemoglobină (g%).

Aparatul (fig. 136) se plasează astfel ca să nu primească lumina solară directă.

Poziția de repaus : maneta *O* la semnul galben. Indicatorul *J* de pe scala *K* să fie la gradația 280, care corespunde cu semnul *C* pe gradația mijlocie. Pentru ajustarea microampermetrului, acul indicator *E* al microampermetrului *D* se reglează în poziție verticală (fără curent), cu ajutorul șurubului *B*. Se deschide aparatul întorcînd butonul la dreapta : apare lumina becului în capacul *H*. Aparatul se lasă deschis în poziție de repaus cel puțin 30 de minute.

Punerea la punct a hemoscopului pentru numărătoarea eritrocitelor se face în felul următor :

— Standardul pentru eritrocite se pune în stativul *F* în unica poziție posibilă datorită formei lui, și se așază în aparat cu partea deschisă spre observator.

— Maneta *O* se pune la punctul roșu *N* ; indicatorul scalei *K* se pune la gradele indicate pe standard : pentru eritrocite la 285 și la litera *C* de pe scală.

— Se apasă butonul *G* (prin apăsări ritmice de 2—3 secunde și simultan se rotește) ; se privește indicatorul *E* și cu ajutorul butonului *P* se corectează deviațiile eventuale ale indicatorului *E*, pînă cînd, la apăsarea și eliberarea butonului *G*, indicatorul nu mai deviază.

— Se pune maneta *O* în poziția *M* — galben și apoi se scoate suportul *F* din aparat.

— Punerea la punct se face înaintea fiecărei măsurători sau a unei serii de măsurători.

Numărătoarea eritrocitelor :

— Se recoltează sîngele din pulpa degetului cu pipeta 2 310 *a*, pînă la semnul *E*.

— Pipeta se goleşte şi se spală în vasul de amestec 2 315 în care se află 25 ml soluţie Gowers pipetată cu pipeta 2 313.

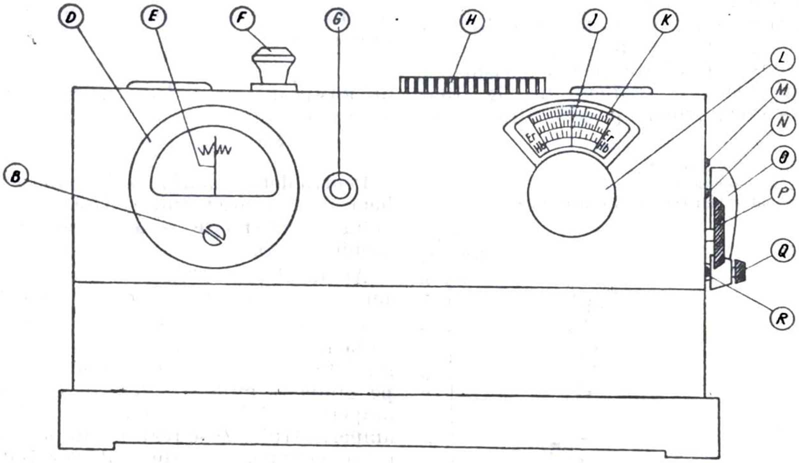


Fig. 136. — Hemoscop Hellige (662 G.A.).

Soluţia Gowers :

— Sulfat de sodiu p.a. sicum	27,6 g
— Acid acetic p.a. (98—100%)	166,5 ml
— Apă distilată pînă la	1 000 ml

Diluţia sîngelui este de 1/2 000.

— Înainte de citire se pune dopul de cauciuc la vasul de amestecare şi se agită răsturnîndu-l de cîteva ori.

— Se umple cuva şi se introduce în suportul *F* care se aşază apoi în hemoscop.

— Maneta se pune la punctul *N* — roşu; se apasă pe *G* şi se observă deviaţia ampermetrului; se roteşte butonul *L* pînă cînd ampermetrul este fără curent (la apăsarea şi eliberarea butonului *G* indicatorul nu se mai deplasează).

— Se citeşte pe scală direct numărul de eritrocite/mm^3 (o diviziune reprezintă 50 000 elemente/1 mm^3). Pentru numărători în serie se schimbă cuva şi se înlocuieşte cu alta.

Punerea la punct a hemoscopului pentru determinarea hemoglobinei. Se procedează astfel :

— Maneta *O* se pune la semnul albastru *R*.

— Standardul albastru de hemoglobină se pune în stativul *F*, iar indicatorul scalei *K* se pune la gradele indicate pe standard : 198 Hb 16 g.

— Se apasă butonul *G* (ca la determinarea de eritrocite) şi cu ajutorul butonului *Q* de pe axul manetei se corectează deviaţiile indicatorului *E* pînă nu mai deviază.

— Maneta se lasă în poziţia *R* pînă cînd se fac determinările.

Determinarea hemoglobinei :

— Se recoltează sînge exact, cu pipeta 2 310 *a* pînă la semnul Hb.

— Se spală pipeta în vasul de amestecare 2 321 în care se află soluţia de amoniac pusă cu pipeta 2 318 *a*.

Soluţia de amoniac :

— Amoniac p.a.		1,6 ml
— Apă distilată	pînă la	1 000 ml

Diluţia este de 1 : 99.

Citirea. Se agită eprubeta prin răsturnare şi se pune soluţia în cuvă.

— Cuva se pune în suportul *F* şi acesta în aparat.

— Se rotește butonul *L* și se apasă ritmic pe *G*, pînă la poziția staționară a indicatorului *E* al ampermetrului.

— Se citește pe scală direct hemoglobina în grame %.

Fiecare diviziune corespunde la 0,5 g Hb %.

— La citirile în serie se lasă maneta în poziția *R*.

DETERMINAREA VOLUMULUI SANGUIN

(Volemia)

Metoda cu albastru Evans. *Principiu.* Se injectează intravenos o soluție de 0,5% albastru Evans, colorant care nu difuzează în țesuturi și se elimină foarte încet. Cunoscînd cantitatea de colorant injectată și determinînd cantitatea lui în plasmă înainte de a începe să fie eliminat, se poate afla volumul plasmei. Cu ajutorul cifrei hematocritului se poate calcula volemia.

Reactivi necesari :

— Anticoagulant : amestec Wintrobe.

— Albastru Evans 0,5% în apă distilată sterilă. După dizolvare completă se filtrează steril. Poate fi conservată la întuneric și în frigider.

Tehnică. Curba de etalonare se determină folosind o scară de diluții a colorantului 0,5% în plasmă umană proaspăt recoltată pe anticoagulant : 0,5 ml din soluția de albastru Evans se completează pînă la 50 ml, obținîndu-se deci diluția 1/100. Din aceasta se obțin alte diluții, conform tabelului 67.

TABELUL 67

Prepararea soluțiilor de colorant pentru etalonarea fotometrului

Colorant în ml	Volumul plasmei servind la diluții	Volumul plasmatic pentru injecția de	
		3 ml	5 ml
0,5 ml de soluție 0,5/100	49,5 ml	300 ml	500 ml
4 ml din diluția 1/100	4 ml	600 ml	1 000 ml
2 ml din diluția 1/100	6 ml	1 200 ml	2 000 ml
1 ml din diluția 1/100	7 ml	2 400 ml	4 000 ml
1 ml din diluția 1/100	9 ml	3 000 ml	5 000 ml
1 ml din diluția 1/100	11 ml	3 600 ml	6 000 ml

Se construiește o curbă a volumelor plasmatice în funcție de extincțiile citite la fotometru, folosind pentru cuva de compensație plasmă normală, recoltată de la pacient, înainte de injectarea colorantului.

Bolnavul este supus unei diete fără grăsimi timp de 24 de ore înaintea probei, pentru a evita o eventuală lipemie, care falsifică rezultatele fotometrice. Cu 12 ore înainte de probă pacientul nu se alimentează și nu bea nimic. În tot acest timp el trebuie să fie în repaus.

Se recoltează bolnavului 10 ml sînge pe anticoagulant și apoi, prin același ac, i se injectează foarte repede 3 ml colorant 0,5%, cu o seringă de precizie. La sfîrșitul injectării se aspiră sînge în seringă și se injectează înapoi, cu scopul de a spăla seringa. Se notează exact momentul cînd s-a injectat tot colorantul și după 3 minute se recoltează 10 ml sînge pe anticoagulant de la celălalt braț. Cele două probe de sînge se centrifughează. Se citește densitatea optică a plasmei colorate, folosind pentru cuva de compensație plasma obținută din sîngele recoltat înainte de injectarea colorantului. Din extincția citită la fotometru se calculează volumul plasmatic pe curba de etalonare. Densitatea optică a plasmei colorate scade rapid; de aceea citirea la fotometru trebuie să se facă imediat după centrifugare.

Metoda cu roșu de Congo folosește soluția de roșu de Congo 1%, filtrată și sterilizată.

Determinarea volumului plasmatic fără curbă de etalonare. Se recoltează 10 ml sînge fără anticoagulant. Se injectează apoi imediat 10 ml soluție de roșu de Congo 1%; după 3 minute se recoltează 5 ml sînge. Probele de sînge se centrifughează și serul se decantează. Se determină extincția ES a serului colorat, cuva de compensație fiind umplută cu ser din sîngele recoltat înainte de injectarea colorantului. Se folosește o cuvă de 0,5 mm³ cu filtru S_{50}. Cu aceleași cuve și filtru se determină extincția EK a următoarei soluții standard : la 1,8 ml ser normal se adaugă 0,2 ml soluție de roșu de Congo 0,1% (soluția de roșu de Congo 1% se diluează de 10 ori). Cuva de compensație este umplută cu 1,8 ml ser normal și 0,2 ml apă distilată.

$$\textit{Calcul}: \frac{\mathrm{EK}}{\mathrm{ES}} = \text{volumul plasmatic în litri.}$$

Determinarea volemiei. Pentru determinarea volemiei prin aceste procedee, pe lîngă cunoașterea volumului plasmatic este necesară și determinarea hematocritului, care se face concomitent cu determinarea volumului plasmatic. Pentru calculul volemiei se determină hematocritul somatic = hematocrit venos × 0,864.

$$\text{Volemia} = \frac{\text{Volum plasmatic} \times 100}{109 - \text{hematocrit somatic}}$$

Exemplu : $\frac{VP \times 100}{100 - h} = \frac{3 \times 100}{100 - 40} = 5$ litri, dacă

$VP = 3$ litri

$h = 40\%$ (hematocrit somatic)

Calcularea volumului globular :

$$VG = \frac{VP \times h}{100 - h} \text{ în care :}$$

VG = volum globular
VP = volum plasmatic
h = hematocrit

Variațiile volemiei și ale fracțiunilor globulare și plasmatice pot fi fiziologice sau patologice.

Variații fiziologice. Volemia ca și fracțiunile globulare și plasmatice prezintă variații fiziologice în funcție de vîrstă (tabelul 68) și alți factori.

TABELUL 68

Hematocrit mediu și volemie medie la diferite vîrste
(după P. Cazal)

	Hematocrit	Volemie (în ml/kg)
Adulți normali	42,5	76,6
Copii de 10—13 kg	40,8	75,4
Sugari de 3—11 luni	39,2	71,5
Nou-născuți	59,7	84,7

După poziție și după activitate : volumul globular nu se modifică cu poziția corpului, volumul plasmatic și volemia variază însă. Ortostatismul se însoțește de o scădere a volumului plasmatic de aproximativ 300 ml la adult. Invers, repausul la pat de cîteva ore produce o creștere a volumului plasmatic în așa fel, încît hematocritul poate să varieze cu 5%. Un repaus prelungit la pat, timp de 2—3 săptămîni, produce o scădere a volumului plasmatic pînă la 500 ml la adult.

În timpul graviditătii : volemia, îndeosebi fracțiunea plasmatică, crește începînd din luna a III-a și atinge un maximum în luna a IX-a care este de 40% mai mult decît normalul pentru volemie, de 50% pentru fracțiunea plasmatică și de numai 22% pentru fracțiunea globulară. Aceste variații explică scăderea simultană a hematocritului venos în jurul cifrei de 36% în luna a IX-a, față de 42% în stare normală.

Variațiile patologice pot să prezinte următoarele variante :

Variații simultane ale hematocritului și volemiei :

— hipervolemie cu hematocrit ridicat : poliglobulii primitive sau secundare;

— hipovolemie cu hematocrit scăzut : anemii cronice.

Variații disociate ale hematocritului și volemiei :

— hipervolemie cu hematocrit normal sau scăzut; creșterea interesează mai mult volumul plasmatic. Se observă în retenții de apă, mai ales la cardiaci și la nefritici;

— hipovolemie cu hematocrit normal; scăderea interesează, atît fracțiunea plasmatică, cît și cea globulară. Se întîlnește în hemoragii acute înainte de perioada de hemodiluție, și în stări de denutriție cronică;

— hipovolemie cu hematocrit ridicat; scăderea interesează volumul plasmatic. Se observă în plasmoragii acute (șoc prin arsură) și în stări cronice de deshidratare prin pierdere de clorură de sodiu.

TABELUL 69

Volemia, volumul plasmatic și globular în ml/kg
(după J. Bernard)

	Bărbat adult normal	Femeie adultă normală
Volemie	76	66
Volum plasmatic	46	43
Volum globular	30	23

TABELUL 70

Volemia, volumul plasmatic și globular exprimate în procente din greutatea corporală (după J. Bernard)

	Adult normal
Volemie	7,6 %±1,2
Volum plasmatic	4,5 %±0,7
Volum globular	3,1 %±0,4

DIAMETRUL ERITROCITAR

Principiu. Măsurarea diametrului a 100 eritrocite pe un frotiu colorat cu May-Grünwald-Giemsa, cu un micrometru ocular etalonat. Înscrierea grafică a rezultatelor procentuale.

Material necesar :

— Micrometru ocular : lamă de sticlă rotundă, cu o scară gravată, care se introduce în diafragma ocularului (fig. 137).

— Micrometru obiectiv : lamă de sticlă avînd în centru o scară de 1 milimetru împărțită în

100 de diviziuni, o diviziune fiind deci de 10 μ.

— Frotiu de sînge colorat cu May-Grünwald-Giemsa.

— Microscop.

Etalonarea micrometrului ocular. Se aşază micrometrul obiectiv pe platina microscopului şi se prinde în cîmpul microscopic scara gravată, lucrînd cu obiectivul de imersie fără ulei de cedru. Se introduce în ocular micrometrul ocular şi prin rotirea ocularului se suprapun, în linie dreaptă, diviziunile micrometrului obiectiv cu cele ale micrometrului ocular. Printr-o regulă de trei simplă se poate afla la cîţi microni corespunde o diviziune oculară, cele obiective fiind cunoscute.

Exemplu: dacă 60 de diviziuni oculare se suprapun la 11 diviziuni obiective, adică la 110μ, 1 diviziune oculară corespunde la 1,8 μ.

Etalonarea micrometrului ocular se poate face şi cu ajutorul reţelei gravate pe lama camerei de numărătoare; un pătrăţel mic, care reprezintă 1/400 mm², are latura de 50 μ. Se prinde reţeaua camerei de numărat în cîmpul microscopului, folosind obiectivul de imersie, şi se suprapun în linie dreaptă diviziunile micrometrului ocular cu diviziunile pătrăţelelor mici.

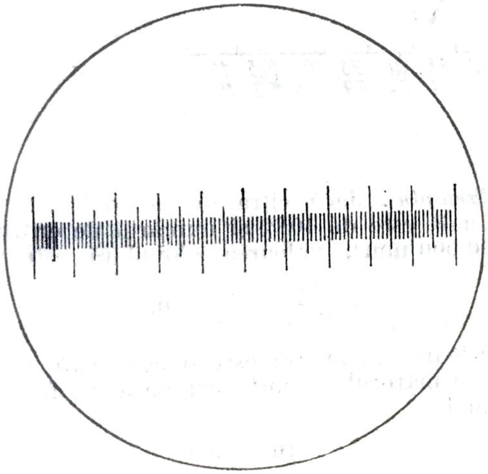


Fig. 137. — Micrometrul ocular.

Exemplu: dacă 83 de diviziuni oculare corespund cu lungimea a 3 pătrăţele, adică la 150 μ, 1 diviziune oculară corespunde cu 1,8 μ.

Etalonarea micrometrului este valabilă pentru microscopul şi sistemul optic (obiectiv şi ocular), ca şi pentru micrometrul folosit în această determinare. Orice schimbare de ocular, de obiectiv sau de micrometru ocular necesită o reetalonare.

Tehnica măsurătorii diametrelor. Se pune la microscop frotiul de sînge pentru determinarea diametrului eritrocitar şi se pune la punct obiectivul cu imersie, în mod obişnuit, micrometrul ocular fiind păstrat în ocular, cu scara gravată aşezată orizontal de la stînga la dreapta. Se plimbă frotiul în sens vertical şi se măsoară eritrocitele care se suprapun pe scara gravată a ocularului. Se măsoară 500 de eritrocite, fără alegere, aducîndu-le în partea centrală a cîmpului. Nu se măsoară celulele distruse sau hemolizate. Măsurătoarea se face în diviziuni oculare, apoi diviziunile oculare se transformă în microni.

Calcularea diametrului mediu eritrocitar. Se adună diametrele celor 100 de eritrocite măsurate şi se împart la 100.

Exemplu: dacă diametrele a 100 eritrocite măsoară 720 μ, diametrul mediu eritrocitar este de 7,2 μ.

Construirea curbei Price-Jones (fig. 138). Se scriu, pe un sistem de coordonate, pe abscisă diviziunile de microni din 0,5 în 0,5, iar pe ordonată numărul procentual de eritrocite care corespund fiecărui diametru.

În mod normal curba se întinde între 5 şi 9 μ, cu diametrul mediu de 7,2 μ şi cu următoarea repartiţie aproximativă:

Diametrul în microni	Eritrocite %
5,5—6	2
6 —6,9	10
7 —7,4	27
7,5—7,9	44
8 —8,4	14
8,5—8,9	3

Ca limite normale ale diametrului mediu se admit 6,68 μ şi 7,72 μ.

Variaţiile diametrului mediu eritrocitar pot fi fiziologice sau patologice.

Variaţii după vîrstă sînt următoarele:

— La nou-născut, în primele două săptămîni, diametrul mediu variază între 8 şi 8,2 μ, cu o anizocitoză importantă.

— După două săptămîni de viaţă diminuează progresiv, pentru a atinge un minim de 7 μ la vîrsta de 12 luni. Apoi creşte încet şi atinge, între 2 şi 9 ani, valorile adultului: 7,2—7,4 μ.

Variațiile patologice ale diametrului mediu eritrocitar sînt studiate în capitolul de patologie a eritrocitului: macrocite, microcite, megalocite, sferocite etc.

În funcție de variațiile diametrului mediu eritrocitar apar *variații în curba Price-Jones*:

— Deviere la stînga: vîrful curbei este situat în jurul cifrei 6 μ: microsferocitoza din icterul hemolitic congenital, microcitoza din anemiile hipocrome.

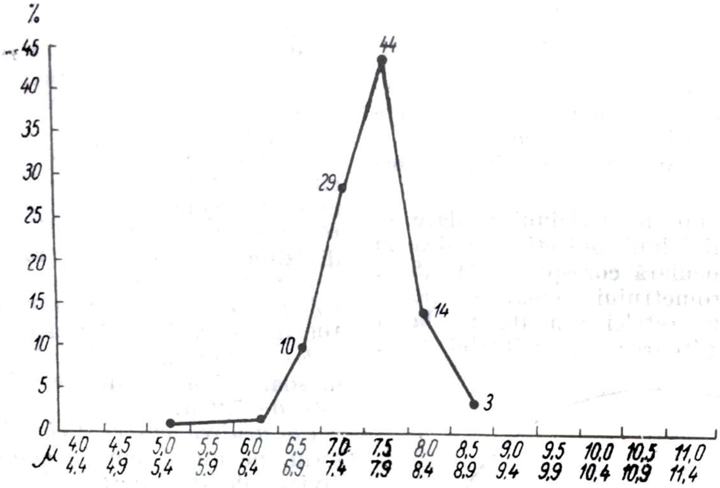


Fig. 138. — Curba Price-Jones.

— Deviere la dreapta: vîrful curbei este situat în jurul cifrei de 9 μ: macrocitoză, megalocitoză.

— Curbă cu două vîrfuri, unul situat în stînga, celălalt în poziție normală: această posibilitate apare cînd în sînge există două populații diferite de eritrocite, așa cum se întîmplă după transfuzii masive sau repetate la bolnavii cu microcitoză sau microsferocitoză; astfel, grupul de eritrocite ale bolnavului este reprezentat de microcite în proporție, de exemplu, de 70% și grupul de eritrocite normale (normocite) corespunde eritrocitelor transfuzate.

— Baza curbei: în mod normal baza curbei se întinde între 5,5 și 8,5 μ, în medie între 5 și 9 μ. În anizocitoză baza este mult lărgită, iar vîrful turtit și deviat la stînga sau la dreapta, după cum predomină microcitele sau macrocitele.

CONSTANTE ERITROCITARE DERIVATE, INDICI

Valoarea globulară (indice de culoare)

Se calculează după următorul raport:

$$\text{Valoarea globulară} = \frac{\text{Hb\%}}{N \times 2}$$

în care N = primele două cifre ale numărului de eritrocite găsite pe mm³.

Exemplu: dacă cifra de hemoglobină procentuală este de 40% și numărul de eritrocite 2 500 000/mm³, valoarea globulară este

$$= \frac{40}{25 \times 2} = \frac{40}{50} = 0{,}8$$

Valoarea globulară este o cifră care rezultă din următorul raport comparativ față de normal:

$$\frac{\dfrac{\text{Hb\%găsită}}{\text{Hb\%normală}}}{\dfrac{\text{Număr eritrocite găsit}}{\text{Număr eritrocite normal}}}$$

Se admit ca cifre normale Hb % = 100% și numărul de eritrocite: 5 000 000/mm³.

Valoarea globulară normală = 1 (0,85—1,15).

Valorile globulare sub 0,85 = hipocromie.

Valorile globulare peste 1,15 = hipercromie.

Noțiunea de hipercromie dată de valoarea globulară nu este o noțiune reală, deoarece concentrația hemoglobinei în eritrocit nu poate depăși cifra normală de 34%. Această neconcordanță provine din faptul că valoarea globulară nu ține seama de volumul eritrocitar mediu. Cînd crește volumul eritrocitar (macrocite) este posibil să crească și cantitatea de hemoglobină, dar concentrația acesteia nu depășește niciodată 34%.

Cu toate acestea, valoarea globulară, deși nereală și relativă, dă relații importante de orientare rapidă pentru alte investigații și reprezintă un procedeu util în practica curentă de laborator.

Volumul eritrocitar mediu = V

Clasificarea corectă a anemiilor — în macrocitare, normocitare sau microcitare — se bazează pe determinarea volumului eritrocitar mediu, care se calculează după următoarea formulă :

$$V = \frac{h \times 10}{N}$$

în care h = cifra hematocritului, iar N = numărul eritrocitelor/mm³ în milioane.

Se exprimă în microni cubi.

Exemplu : pentru un hematocrit de 45% și un număr de eritrocite de 5 000 000 pe mm³, volumul eritrocitar mediu este $= \frac{45 \times 10}{5} = 90$ microni cubi.

Valori normale = 82—92 μ^3 = normocite.

Volumul eritrocitar mediu crescut — macrocite și megalocite : 110—140 μ^3.

Volumul eritrocitar mediu scăzut — microcite = 50—70 μ^3.

Grosimea eritrocitară medie = G

Se consideră eritrocitul ca un disc plat, ca o monedă, fără depresiune centrală, și se calculează grosimea după formula :

$$G = \frac{4\,V}{\pi D^2} \text{ în care}$$

V = volumul eritrocitar mediu.

D = diametrul eritrocitar mediu.

Cifre normale = 2,1 μ, cu variații între 1,7 și 2,5 μ.

Cifre peste 2,5 μ = sferocitoză.

Cifre sub 1,7 μ = platicit (leptocit).

În fig. 139 este redată o abacă pentru determinarea grosimii eritrocitare medie, cunoscînd volumul și diametrul.

Se duce o linie verticală de la cifra volumului (scara gradată orizontală de jos) pînă se întîlnește linia oblică, care reprezintă diametrul mediu al eritrocitelor ; din punctul de intersecție se duce o orizontală spre stînga, citind direct grosimea eritrocitului pe scara gradată din stînga.

Indicele de sfericitate = I.S.

Este raportul dintre diametrul mediu (D) și grosimea medie (G) $= \frac{D}{G}$

Normal I. S. = 3,4, cu limite între 3,1 și 3,7.

Indicele de sfericitate mare se traduce prin turtirea eritrocitului = platicitoză. Cînd I. S. este micșorat este vorba de sferocitoză.

Suprafața eritrocitară medie = S

Se calculează după formula :

$$S = \frac{\pi D^2}{2} + \frac{4V}{D} \text{ în care}$$

D = diametrul eritrocitar mediu

V = volumul eritrocitar mediu

Valori normale : $S = 130\ \mu^2$ cu limite între 120 și 135 μ^2.

Conținutul eritrocitar mediu în hemoglobină

Reprezintă cantitatea de hemoglobină conținută într-un eritrocit, exprimată în microgamma ($\gamma\gamma$).

Se calculează după următoarea formulă :

$$\text{Conținut Er. mediu Hb} = \frac{\text{Hb(g la 1 000 ml sînge)}}{\text{N}}$$

în care

Hb = exprimată în grame la 1 000 ml sînge.

N = numărul de eritrocite pe mm³ în milioane.

Exemplu : pentru 150 g hemoglobină la 1 000 ml sînge și un număr de eritrocite de 5 000 000 pe mm³

$$\frac{Hb}{N} = \frac{150}{5} = 30 \text{ microgama}$$

Valori normale = 26—31 microgama.

Valori mai mari se găsesc la macrocite și megalocite și valori subnormale în microcite.

Concentrația eritrocitară medie în hemoglobină

Reprezintă concentrația în hemoglobină a eritrocitului exprimată în procente, adică cît la sută din volumul eritrocitului este ocupat de hemoglobină. Se calculează după următoarea formulă:

Concentraţia Er. medie în Hb =

$$= \frac{\text{Hb(g la 100 ml sînge)} \times 100}{\text{hematocrit}}$$, în care Hb = grame de hemoglobină la 100 ml sînge.

Exemplu: pentru o probă care are 15 g hemoglobină la 100 ml şi hematocritul 45:

$$\frac{15 \times 100}{45} = 33\%$$

valorile normale variază între 32% şi 34%.

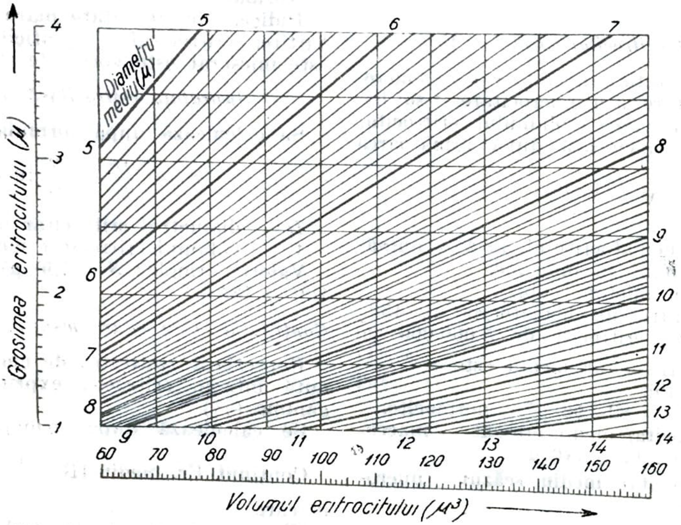


Fig. 139. — Abacă pentru determinarea grosimii eritrocitare medie din volum şi diametru. Se ridică o linie verticală de la cifra care indică volumul pînă întîlneşte linia oblică a diametrului. Din acest punct se duce o linie orizontală spre stînga pînă întîlneşte scara „grosimea eritrocitului" (după Haden).

Concentraţia de hemoglobină nu depăşeşte 34% cînd volumul eritrocitar creşte, de aceea nu există hipercromie. În microcitoză şi hipocromie concentraţia scade la 28%, 25% etc. (pentru detalii, a se vedea macrocitoza, microcitoza, hipocromia şi hipercromia).

REZISTENŢA GLOBULARĂ

Rezistenţa osmotică este rezistenţa eritrocitelor la soluţii hipotonice.

Principiu. Metoda se bazează pe comportarea eritrocitelor în soluţii de ClNa de diferite concentraţii hipotonice, indicînd concentraţiile unde începe hemoliza şi unde hemoliza este totală.

Material şi reactivi:

— Clorură de sodiu soluţie 7‰ (substanţă p.a., cîntărire făcută la balanţa de precizie).

— Apă distilată.

— Eprubete de hemoliză.

Tehnica diluţiilor cu picătura. Cu ajutorul unei pipete Pasteur se repartizează picăturile de apă distilată într-o serie de eprubete de hemoliză. Cu aceeaşi pipetă se repartizează picăturile de clorură de sodiu 7‰. Se recoltează sînge din venă, fără anticoagulant, şi imediat, cu o pipetă Pasteur uscată, se repartizează în fiecare eprubetă cîte o picătură de sînge. Se agită eprubetele uşor, pentru a omogeniza sîngele. Se lasă eprubetele la temperatura camerei timp de 30 de minute, după care se pot centrifuga şi se fac citirile, sau se lasă să se sedimenteze spontan 3 ore. Citirea se poate face şi după 24 de ore, cu condiţia ca stativul să fie păstrat la + 4°.

Hemoliza iniţială: prima eprubetă care prezintă un supernatant hemolizat, roz.

Hemoliza totală: prima eprubetă care nu prezintă sediment de eritrocite, toate fiind hemolizate.

Valorile normale sînt: hemoliză iniţială la 0,46–0,42% ClNa şi hemoliză totală la 0,38 – 0,34% ClNa.

Cînd hemoliza iniţială apare la concentraţii mai mari de ClNa rezistenţa osmotică este scăzută, iar cînd hemoliza iniţială apare la concentraţii mai mici, rezistenţa este crescută.

TABELUL 71

Tehnica diluţiilor cu picătura pentru determinarea rezistenţei osmotice globulare

Eprubeta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Apă distilată în picături	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ClNa 7‰ (în picături)	34	33	32	31	30	29	28	27	26	25	24
Titrul soluţiei (concentraţie %)	0,68	0,66	0,64	0,62	0,60	0,58	0,56	0,54	0,52	0,50	0,48
Eprubeta	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**
Apă distilată (în picături)	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
ClNa 7‰ (în picături)	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13
Titrul soluţiei (concentraţie %)	0,46	0,44	0,42	0,40	0,38	0,36	0,34	0,32	0,30	0,28	0,26

Tehnica diluţiilor cu pipeta gradată. În 21 de eprubete (tabelul 72, care reprezintă schema parţială) se repartizează cîte 1 ml din diferite concentraţii de ClNa, concentraţii care descresc de la 0,7 la 0,3%, pornind de la o soluţie de 1% ClNa. Se aspiră de fiecare dată într-o pipetă gradată o cantitate de 1 ml din soluţia 1% de ClNa şi se adaugă 0,7 ml în primul tub şi restul de 0,3 ml la al 21-lea tub; la a doua pipetare se adaugă 0,68 ml în al doilea tub şi restul de 0,32 ml în al 20-lea tub, şi aşa mai departe. La pipetarea apei distilate se procedează invers.

Se recoltează sînge venos şi cu ajutorul unei pipete Pasteur se adaugă în fiecare tub o picătură de sînge, rapid, imediat după recoltare. Se agită fiecare eprubetă şi se aşteaptă 30 de minute la temperatura laboratorului, se centrifughează şi se notează concentraţia primei eprubete care prezintă un supernatant cu aspect roz — începutul hemolizei — şi prima eprubetă la care nu se observă sediment de eritrocite: hemoliza totală.

Citirea se mai poate face după 3 ore, cînd sedimentarea este foarte înaintată, fără să fie nevoie de centrifugare, sau se poate citi după 24 de ore, cu condiţia ca stativul să rămînă în frigider la + 4°. Rezultatele sînt identice cu cele obţinute la tehnica cu picătura.

Variaţii patologice se pot observa într-un sens sau altul.

Rezistenţa osmotică scăzută se observă în icterul hemolitic congenital, în care hemoliza iniţială poate să apară foarte aproape de izotonie: 0,70% – 0,50% ClNa. Rezistenţa osmotică este scăzută în intoxicaţii cu benzen, uneori în hepatita epidemică.

Rezistenţa osmotică crescută se observă în talasemie, în care hemoliza iniţială apare la concentraţii mai mici de ClNa sau apare o deplasare cu 6 sau 10 eprubete spre hipotonie a hemolizei totale. Sîngele de bolnav de talasemie prezintă o creştere a hemolizei totale după o expunere de 24 de ore la 37°. Rezistenţa

TABELUL 72

Tehnica diluţiilor cu pipeta gradată pentru determinarea rezistenţei osmotice globulare

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sol. ClNa 1% în ml	0,70	0,68	0,66	0,64	0,62	0,60	0,58	0,56	0,54	0,52	0,50	0,48
Apă distilată în ml	0,30	0,32	0,34	0,36	0,38	0,40	0,42	0,44	0,46	0,48	0,50	0,52
Concentraţia % ClNa	0,70	0,68	0,66	0,64	0,62	0,60	0,58	0,56	0,54	0,52	0,50	0,48

osmotică poate fi crescută după hemoragii acute, datorită rezistenței crescute a eritrocitelor tinere, după splenectomie, uneori în anemia Biermer, în icterul mecanic, ca și în anemiile feriprive.

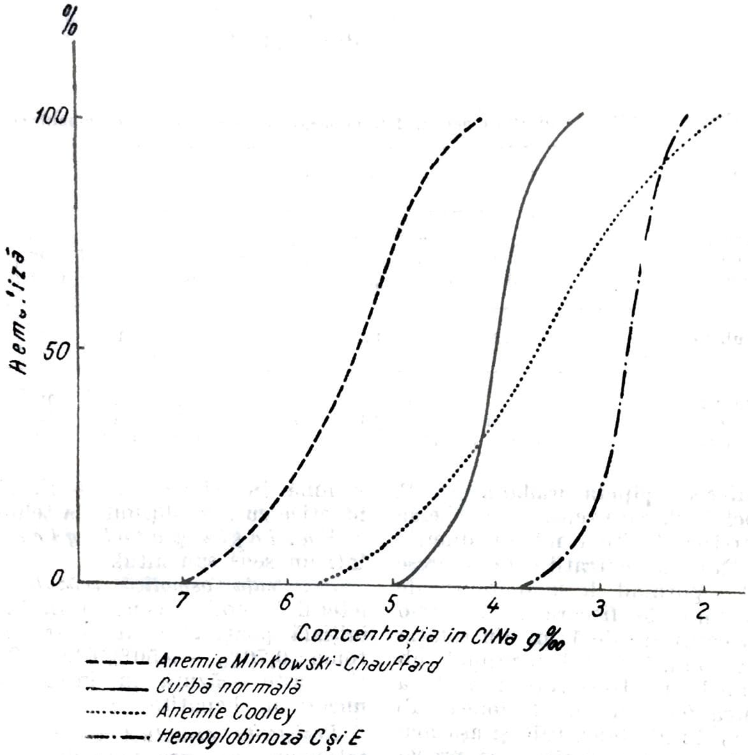


Fig. 140. — Curbe de hemoliză.

Stabilirea unei curbe de hemoliză. Pentru stabilirea unei curbe de hemoliză este necesar ca sîngele adăugat în fiecare eprubetă să fie în cantitate identică. Se recomandă în acest scop utilizarea unei pipete hematimetrice, pipeta de hemoglobină cu capacitate de 20 mm^3. Diluțiile hipotonice se fac cu un volum final de 2 ml, la care se adaugă cîte o pipetă cu sînge în fiecare, realizînd astfel o diluție a sîngelui de 1/100. Se agită, se așteaptă să se producă hemoliza, 30 de minute, se centrifughează și se dozează la fotometru hemoglobina din fiecare supernatant. Ca probă albă (zero) se consideră un supernatant lipsit de hemoglobină, iar tubul cu hemoliza totală se socotește 100% hemoliză. Se fac extincțiile și cu o regulă de trei se poate afla în procente cîtă hemoglobină există în fiecare supernatant din intervalul 0—100%. Curba reprezintă procente de hemoglobină din supernatant în funcție de concentrația în ClNa.

REZISTENȚA MECANICĂ A ERITROCITELOR

Principiu. Se verifică rezistența eritrocitelor la o anumită solicitare mecanică.

Tehnică. Se defibrinează sîngele cu perle. Se determină hematocritul. Se corectează hematocritul prin adaos sau sustragere de ser propriu, pentru a obține cifra de 35%. Se pun 2 ml sînge într-un vas Erlenmeyer de 50 ml capacitate, conținînd 20 de perle de sticlă șlefuite, de 4 mm diametru. Vasul este fixat orizontal pe o roată turnantă verticală, în așa fel ca axul vasului să fie la 3,25 cm de axul roţii. Roata trebuie să se învîrtească cu o viteză de 40 de turaţii/minut, timp de 2 ore.

După 2 ore de rotaţie se procedează astfel:

— Se ia din vas 0,1 ml sînge şi se amestecă cu 9,9 ml soluţie amoniacală 0,4%; se face extincţia E_1 la fotometru.

— Restul sîngelui se aspiră cu pipeta de pe perle şi se centrifughează. Din serul supernatant hemolizat se ia 0,25 ml şi se amestecă cu 4,75 ml soluţie amoniacală; se face extincţia E_2.

— La 0,25 ml ser iniţial (nehemolizat) se adaugă 4,75 ml soluţie amoniacală; se măsoară extincţia E_3.

Se lucrează cu o cuvă de 5 mm grosime şi cu filtrul S_{57}; cuva pentru proba albă se umple cu apă distilată.

Calcul:

$$\text{Hemoliza } \% = \frac{(E_2 - E_3) \times 100}{(E_1 - E_3) \times 5} \text{ în care,}$$

E_1 = extincţia sîngelui complet hemolizat diluat 1/100.

E_2 = extincţia serului hemolizat diluat 1/20.

E_3 = extincţia serului netratat diluat 1/20.

Valori normale: gradul de hemoliză a unui sînge normal este, cu acestă tehnică, sub 15%.

Rezistenţa mecanică este scăzută considerabil în majoritatea anemiilor hemolitice. În unele anemii hemolitice cu rezistenţă osmotică normală sau crescută, ca în talasemie, există o netă scădere a rezistenţei mecanice.

VITEZA DE SEDIMENTARE A ERITROCITELOR

Principiu

Dacă sîngele este tratat cu un anticoagulant şi lăsat în repaus, eritrocitele se sedimentează după un timp variabil.

Metoda Westergreen este cea mai mult utilizată.

Material şi reactivi:

— Seringă şi ac de puncţie venoasă.

— Eprubete de hemoliză.

— Pipete Westergreen cu diviziuni milimetrice de la 0 la 200.

— Stativ.

— Pipete gradate de 2 şi 1 ml.

— Citrat trisodic 3,8%.

Tehnica. Cu o pipetă gradată de 1 ml, se pune într-o eprubetă de hemoliză 0,4 ml citrat trisodic 3,8%. Se scoate prin puncţie venoasă, dacă se poate ridicînd garoul, o cantitate de 2—3 ml sînge, care se pune într-o eprubetă uscată. Se aspiră imediat 1,6 ml sînge cu ajutorul unei pipete gradate de 2 ml şi se adaugă în eprubeta care conţine 0,4 ml citrat 3,8%. Se amestecă. Se aspiră sîngele în pipeta Westergreen pînă la diviziunea 0, apoi se astupă cu arătătorul partea de sus, pentru a se opri pe loc coloana de sînge. Vîrful pipetei se aplică pe dopul de cauciuc de la partea inferioară a stativului, iar capătul superior al pipetei se fixează în partea de sus a stativului (fig. 141). Pipeta trebuie să fie în poziţie perfect verticală. Se notează ora. Citirea se face după 1 şi 2 ore. Rezultatul se dă în milimetri.

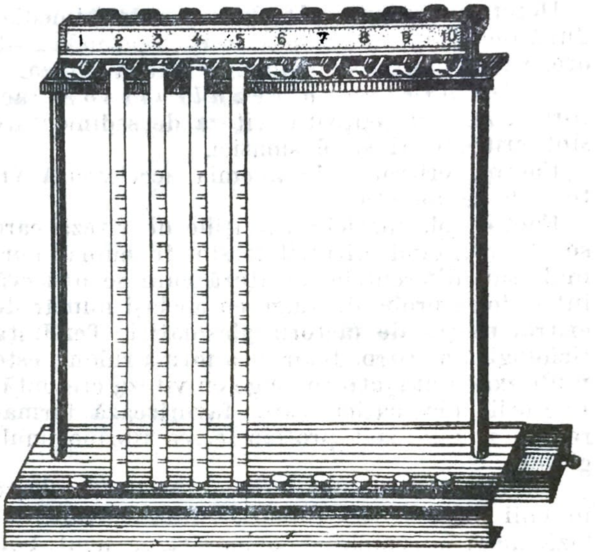


Fig. 141. — Aparat Westergreen.

Cifre normale la adulţi:

	1 oră	2 ore
Bărbat:	1—10 mm	7—15 mm
Femeie:	2—13 mm	12—17 mm
Copii mici şi sugari:		9—12 mm

Condiţiile tehnice care trebuie asigurate în determinarea vitezei de sedimentare după metoda Westergreen sînt:

— Tubul de sedimentare trebuie să aibă o înălţime gradată de 200 mm.

— Diametrul trebuie să fie mai mare de 1 mm; în general se preferă diametrul de 2,5 mm sau 3 mm.

— Tubul trebuie să fie perfect cilindric şi curat.

— Cînd pe tub nu sînt imprimate diviziuni, citirea se face cu o linie milimetrică.

— Poziția tubului trebuie să fie verticală; în tuburi înclinate viteza este mai mare. Procedeul Fuente-Hita, care folosește tuburi înclinate de 45°, arată o viteză de 4 ori mai rapidă. Pentru controlul verticalității în metoda Westergreen se folosește, montat pe aparat, un fir de plumb.

— Anticoagulantul folosit în mod unanim este citratul de sodiu. Folosirea oxalatului de sodiu dă viteze mai accelerate.

Determinarea vitezei trebuie să se facă imediat după recoltare sau cel mai tîrziu în primele 2—3 ore. Conservarea sîngelui micșorează viteza.

Interpretarea rezultatelor. Factorii care influențează viteza de sedimentare sînt eritrocitari și plasmatici.

Factori eritrocitari : anemia accelerează viteza de sedimentare.

Factori plasmatici : variațiile de viteză care se observă cînd eritrocitele sînt în număr normal, sau diferențele de viteză care se observă între două probe de sînge cu același număr de eritrocite țin de factorii plasmatici. Tendința fiziologică a eritrocitelor de a forma rulouri este mult exagerată într-un sînge cu viteza crescută. Factorii plasmatici care favorizează formarea de rulouri sînt proteinele, ca fibrinogenul, globulinele.

Viteza de sedimentare a eritrocitelor crește în boli infecțioase sau inflamatoare : tuberculoză activă, reumatism poliarticular acut, boli infecțioase, inflamații, septicemii ;

— în hemopatii : leucoze, reticuloze, ca și în mielom, în boala Hodgkin etc. ;

— în nefroze, în infarctul cardiac.

Măsurarea și urmărirea vitezei permit, de asemenea, urmărirea evoluției unei infecții (în tuberculoză).

Valori scăzute se găsesc în hepatita epidemică, în stările alergice.

Variații fiziologice : la femeie, în timpul menstruației viteza crește ; valori crescute se întîlnesc în sarcină, mai ales în ultimele luni ; la copii viteza este ceva mai mare decît la adult.

METODE DE COLORARE ȘI REACȚII CITOCHIMICE DE EXPLORARE A SERIEI ERITROCITARE

CERCETAREA RETICULOCITELOR

Principiu. Reticulocitele (fig. 142) se pun în evidență prin colorații vitale, în care sîngele scos din organism, fără să fie fixat, se pune în contact cu colorantul.

Materiale necesare:

— Albastru briliant de crezil soluție 1% în alcool absolut.

— Cutie Petri căptușită cu hîrtie de filtru umezită (cameră umedă).

Tehnică. Se întinde pe o lamă un frotiu subțire din soluția colorantă, se usucă, apoi se întinde sîngele pe această lamă, ca pentru orice frotiu. Se pune în cameră umedă timp de 1 minut și se usucă la aer. Se examinează cu obiectivul cu imersie. Pentru ușurarea numărătorii se aplică în diafragmul ocularului o rondelă de hîrtie cu o fereastră tăiată în pătrățel, pentru limitarea cîmpului microscopic.

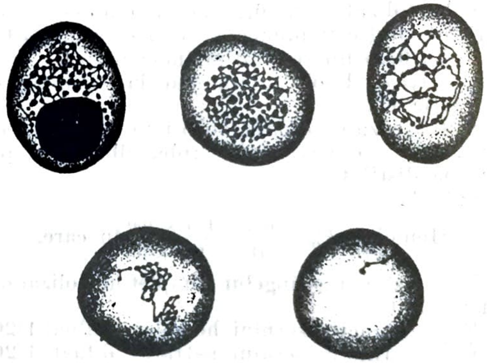


Fig. 142. — Diferite tipuri de reticulocite.

Tehnica cu albastru briliant de crezil în ser fiziologic. Într-o eprubetă se amestecă :

— Albastru briliant-crezil 1% în ser fiziologic 3 picături.

— Oxalat de sodiu 1% în ser fizologic 12 picături.

— Sînge 2—3 picături.

După un contact de cel puțin 30 de minute se centrifughează ușor 3 minute. Din eritrocitele sedimentate se întind frotiuri subțiri pe lamă, după omogenizarea sedimentului. Întinderea frotiului se poate face mai bine după 1—2 ore de contact, cînd eritrocitele sînt spontan sedimentate, fără să necesite centrifugare. Această metodă cu colorantul dizolvat în ser fiziologic prezintă o serie de avantaje : nu necesită alcool absolut, reacția apare netă cu orice colorant, indiferent de procedeul de preparare, dar cel mai mare avantaj al metodei este sensibilitatea ei și posibilitatea întinderii unor frotiuri subțiri și uniforme, care permit o decelare a reticulocitelor pînă la clasa a IV-a. Numai prin acest procedeu se poate face o apreciere a reticulocitelor pe clase.

Numărătoarea reticulocitelor se face cu obiectivul cu imersie. Se numără reticulocitele întîlnite la 1 000 de eritrocite.

Interpretarea rezultatelor. În mod normal numărul reticulocitelor variază între $4^{0}/_{00}$ şi $18^{0}/_{00}$. Pentru a stabili *valorile absolute* se calculează numărul de reticulocite/mm^3, cunoscînd numărul de eritrocite.

Creşterea numărului de reticulocite indică procese de regenerare sporită în măduvă. Constatarea unui număr de peste $18^{0}/_{00}$ reticulocite indică o activitate anormală a măduvei şi necesitatea de a face cercetări suplimentare, pentru decelarea cauzei hiperactivităţii medulare:

– În anemii hemolitice cronice sau acute.

– După hemoragii acute sau cronice, hemoragii oculte.

– Răspuns reticulocitar faţă de medicamente folosite în terapeutică, ca: extract de ficat, vitamina B_{12}, C, B_1, fier, hemoterapie sub diferite forme (transfuzie i. v., sînge i.m., autohemoterapie).

– La femei gravide izoimunizate prin sarcină (incompatibilitate serologică feto-maternă) creşte numărul de reticulocite (testul Kondi-Iacobescu).

– La nou-născut se găseşte, în mod fiziologic, un număr crescut de reticulocite: 40–$45^{0}/_{00}$.

Constatarea unei reticulocitoze arată că măduva este capabilă să reacţioneze (anemie regenerativă). Din contră, cînd nu există răspuns reticulocitar într-o anemie, prognosticul este totdeauna rezervat (anemie aregenerativă), cu numărul de reticulocite scăzut.

Testul reticulocitelor

(*Kondi şi Iacobescu*)

Atunci cînd între serul mamei şi eritrocitele fătului există un conflict imunologic care provoacă liza eritrocitelor fetale, creşte numărul reticulocitelor în sîngele matern (boala hemolitică a nou-născutului).

Această reacţie reticulocitară care apare la mamă este rezultatul trecerii în circulaţia maternă a factorilor care provin din liza eritrocitelor fetale.

Studiul unui număr mare de gravide izoimunizate prin sarcină, comparativ cu gravidele normale neizoimunizate, a arătat că există un paralelism între prezenţa anticorpilor imuni în sîngele mamei, reacţia reticulocitară maternă şi apariţia bolii hemolitice la nou-născut.

Multiplele determinări efectuate la gravidele normale neizoimunizate au arătat că cifra maximă fiziologică a reticulocitelor este de pînă la $18^{0}/_{00}$ în sîngele periferic.

Ori de cîte ori există un număr de reticulocite crescut peste această cifră, conflictul imunologic feto-matern este în plină desfăşurare şi poate fi confirmat prin probele serologice şi, la naştere, prin manifestarea bolii la nou-născut. În astfel de cazuri numărul reticulocitelor variază între $23^{0}/_{00}$ şi $55^{0}/_{00}$. Se vor exclude, bineînţeles, reticulocitozele mamei datorite afecţiunilor hemolitice cronice sau acute, intoxicaţiilor cu plumb, arsenic sau alte toxice hemolitice, precum şi reticulocitoza din anemiile posthemoragice sau alte tipuri de anemii, din cursul terapiei anemiilor de sarcină cu extract de ficat, fier, vitamină C, vitamină B_1, hemoterapie sub diferite forme.

O problemă importantă în cursul unei sarcini la o femeie izoimunizată este precizarea gradului de afectare a fătului încă din cursul vieţii intrauterine.

Numeroasele determinări efectuate în această direcţie cu ajutorul testului reticulocitelor au arătat că în majoritatea cazurilor, cu cît numărul reticulocitelor este mai mare, cu atît boala se manifestă mai grav. Totuşi nu există totdeauna un paralelism între numărul de reticulocite şi gravitatea bolii.

În cazul gravidelor Rh_0 (D) negative, cu soţii Rh_0(D) pozitivi, izoimunizate, cu anticorpi anti-Rh prezenţi în sînge, care nasc un copil Rh negativ, soţul fiind heterozigot, testul a arătat un număr de reticulocite normal în tot cursul sarcinii.

Aceasta demonstrează valoarea testului reticulocitelor ca singurul test capabil să deceleze, în cursul graviditäţii, conflictul imunologic feto-matern, putînd preciza prognosticul bolii încă din timpul graviditäţii.

METODA PENTRU COLORAREA ACROMOCITELOR ȘI ACROMORETICULOCITELOR

Tehnică. Se colorează sîngele ca pentru reticulocite cu metoda care folosește albastrul briliant de crezil în ser fiziologic.

Se fac frotiuri subțiri, care se fixează cu alcool metilic timp de 90 de secunde, apoi se colorează 6—12 ore cu soluție Giemsa (25 de picături la 10 ml apă neutră); colorarea se face la rece, în frigider, după care se spală și se usucă frotiurile.

Rezultate. În anemii, în special în anemii megaloblastice, se întîlnesc acromocite colorate în roz palid; acromoreticulocitele prezintă rețeaua caracteristică, identică cu a reticulocitelor.

EVIDENȚIEREA CORPUSCULILOR HEINZ

Reactivi: albastru de Nil soluție 1% în ser fiziologic.

Tehnică. Într-o eprubetă se pun 5 picături soluție de albastru de Nil și 10 picături soluție de oxalat Na 1% în ser fiziologic și se adaugă 2 picături de sînge, proaspăt recoltat, cu ajutorul unei pipete Pasteur, după înțeparea degetului. Se amestecă. Se lasă o oră. Din sedimentul eritrocitar omogenizat se întind frotiuri.

Rezultate. Corpusculii Heinz apar ca puncte albastru închis, unice sau multiple într-un eritrocit; sînt dispuse deseori marginal, fondul eritrocitelor fiind colorat în albastru palid (fig. 143).

Sînt prezente în toate intoxicațiile cu nitrobenzeni și dinitrobenzeni, acetanilidă, paraaminofenol, fenilhidrazină, unele sulfonamide.

Tehnica cu cristal violet: vezi anemii hemolitice prin deficiență în G-6-P.D.

EVIDENȚIEREA PUNCTAȚIILOR BAZOFILE ALE ERITROCITELOR

Materiale:

— Albastru de metilen soluție 1%.

— Alcool metilic.

Tehnică:

— Se fixează lama 3 minute cu alcool metilic. Se usucă.

— Soluția de albastru de metilen 1% se diluează în proporție de 1 picătură la 4 ml apă de robinet. Se acoperă lama fixată, cu soluția albastru de metilen diluat. Se lasă o oră.

— Spălare. Uscare.

Rezultate. Pe fondul albastru-verzui palid al eritrocitelor punctațiile bazofile apar colorate în albastru intens.

Numărătoarea se face cu imersie, ca pentru reticulocite.

Despre semnificația și caracterele lor se va discuta la patologia eritrocitului.

COLORAREA PICĂTURII GROASE PENTRU HEMATOZOAR ȘI SPIROCHETA OBERMEYERI

Tehnică:

— Se înțeapă pulpa degetului și se aplică pe lamă 2 picături de sînge suficient de mari pentru a avea un diametru de 1—1,5 cm.

— Se așteaptă pînă cînd picăturile sînt perfect uscate. Nu se fixează.

—Se acoperă lama cu soluție Giemsa, soluție care se schimbă de 2—3 ori pentru a spăla hemoglobina provenită din liza eritrocitelor. Colorarea durează 40 de minute.

— Se spală foarte atent cu apă, fără ca jetul să cadă pe preparat. O spălare grăbită antrenează preparatul, care este nefixat și în strat gros.

— Se lasă pentru uscare la temperatura camerei.

Rezultate. Eritrocitele nu se văd, fiind lizate. Hematozoarul este colorat în violet-roșu și apare liber pe lamă, datorită distrugerii eritrocitelor. *Spirocheta Obermeyeri* (febră recurentă) se colorează în violet-albastru.

STUDIUL FIERULUI

Fierul seric. Practic, prima investigație este dozarea fierului seric. De multe ori valoarea sideremiei dă o orientare asupra cantității de fier din organism, dat fiind că sideremia începe să scadă cînd rezervele sînt epuizate. Se pot întîlni situații cînd sideremia este scăzută și rezervele crescute (infecții, stări febrile).

Rezultă deci că o investigație importantă este cercetarea rezervelor de fier prin aprecierea hemosiderinei din frotiul medular, prin tehnici citochimice.

Proba capacității de fixare a serului. Fierul este transportat în plasmă de o proteină, o β_1-globulină, siderofilina sau transferina. Această proteină formează cu sărurile de fier o combinație colorată în roz, care permite dozarea. Se măsoară capacitatea latentă de fixare prin cantitatea de fier ce se poate adăuga serului *in vitro*, pînă cînd colorația roz a serului nu mai crește. Această capacitate latentă a serului de a fixa fierul se exprimă în γ (gamma) de fier pentru 100 ml și reflectă cantitatea de siderofilină.

Sideremia și procentul de siderofilină variază în general în sens invers; cînd fierul seric scade, siderofilina crește, și invers, cînd fierul seric crește, siderofilina scade. În anumite stări infecțioase scad, atît fierul seric, cît și siderofilina. Capacitatea latentă de fixare, adăugată la fierul seric, indică capacitatea totală de fixare (pentru amănunte de tehnică a se vedea la capitolul „Chimie biologică").

Coeficient de saturație: este raportul dintre fierul seric și capacitatea totală de fixare:

$$\frac{\text{Fier seric}}{\text{capacitate totală}}$$

În mod normal acest coeficient este de 0,39, cu variații între 0,20 și 0,65, și scade mult în anemiile prin carența de fier, în care siderofilina este intens desaturată. Raportul crește pînă la 0,80 în cursul sindroamelor hemolitice și în anemia Biermer. Valori cuprinse între 0,80 și 1 caracterizează hemocromatozele și hemosiderozele posttransfuzionale.

Proba hipersideremiei provocate. *Principiu.* Administrarea perorală de fier bivalent permite să se măsoare absorbția digestivă a fierului prin dozarea acestuia în ser.

Metodă. Bolnavul nu mănîncă și stă la pat pe toată durata probei. Se recoltează pe nemîncate o probă de sînge venos cu precauțiile indicate la determinarea sideremiei. Apoi bolnavul primește *per os* 200—500 mg fier bivalent, sub forma unui produs comercial-uzual. După 2, 4, 6, și eventual 8 ore se mai recoltează cîte o probă de sînge. Se determină fierul seric în toate aceste probe.

Interpretare. În mod normal fierul seric se ridică pînă la 250—300γ la 100 ml între a doua și a patra oră după administrare și scade progresiv, pentru a reveni la normal după 6—8 ore, formînd o curbă în triunghi.

În anemii feriprive se constată o creștere marcată a fierului seric, înălțimea triunghiului curbei fiind crescută și valoarea sideremiei inițiale fiind joasă.

În anemiile hipocrome infecțioase sau neoplazice, deși există valori inițiale joase ale sideremiei, nu apare o hipersideremie provocată. În astfel de cazuri resorbția se face, însă fierul trece foarte rapid în țesuturi, ceea ce nu permite sporirea lui în ser. În anemiile hipocrome datorite tulburărilor de resorbție a fierului — cloranemie achilică, anemie după rezecție gastrică (agastrică) — hipersideremia este puțin accentuată. În anemiile hipersideremice nu apare o hipersideremie provocată.

TABELUL 73

Variațiile fiziologice ale fierului seric (FS). Valori medii în gamma (γ) % cu variații de ± 10%
(după J. Bernard)

Vîrsta	FS	Vîrsta	FS
Nou născut	173	1—3 ani	99
1/2—2 luni	142	3—7 „	124
2—4 „	113	7—14 „	119
4—6 „	78	Adult : bărbat	130
6—12 „	93	Adult : femeie	90

CERCETAREA SIDEROBLAȘTILOR ȘI SIDEROCITELOR (HEILMEYER)

Aceste metode constau în punerea în evidență a granulațiilor de hemosiderină în eritroblaști, eritrocite și în celulele sistemului reticulo-histiocitar.

Tehnică. Se colorează întîi frotiul în mod obișnuit, după metoda panoptică May-Grünwald-Giemsa. Urmează colorarea pentru fier timp de 4 minute cu următoarea soluție, preparată totdeauna proaspăt:

Ferocianură de potasiu	1 g
Acid clorhidric 37% purisim	1 ml
Apă distilată (lipsită de fier)	100 ml

Se spală apoi cu apă distilată. Se usucă.

Numărătoarea se face într-o cameră întunecoasă. Se numără 2 000 de eritrocite sau eritroblaști (sînge periferic sau măduvă). Rezultatul se exprimă la mia de elemente.

Rezultate. În sîngele periferic, în mod normal, se găsesc 0—3‰ siderocite.

În măduvă, la o sideremie de 80—100 γ% se găsesc circa 10—20% sideroblaști.

Granulele de fier sînt mici, albastre, în număr redus: 1—5—6, pe fondul roz al hemoglobinei (fig. 144).

Variații. În caz de creștere mai marcată a fierului, sideroblaștii pot ajunge pînă la 70%, iar numărul siderocitelor este mult mai mare în măduvă decît în sîngele periferic. Numărul siderocitelor din sîngele periferic este constant crescut după splenectomie. Este crescut în anemii hemolitice și în saturnism, în anemia Biermer etc. În stările feriprive lipsesc și side-

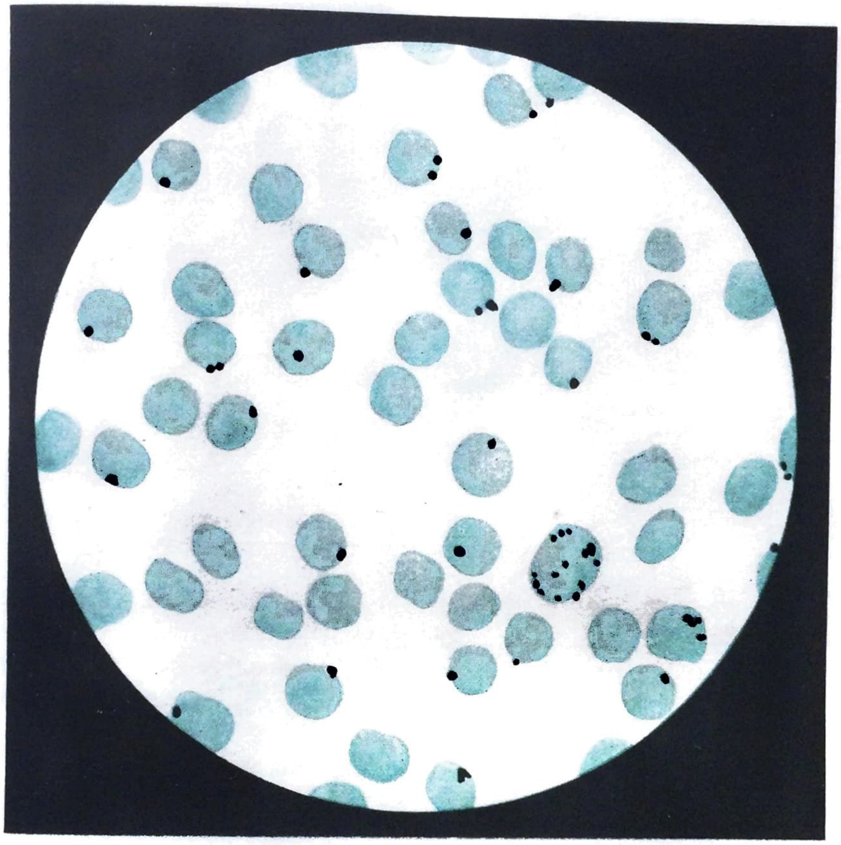


Fig. 143. — Corpusculii Heinz.

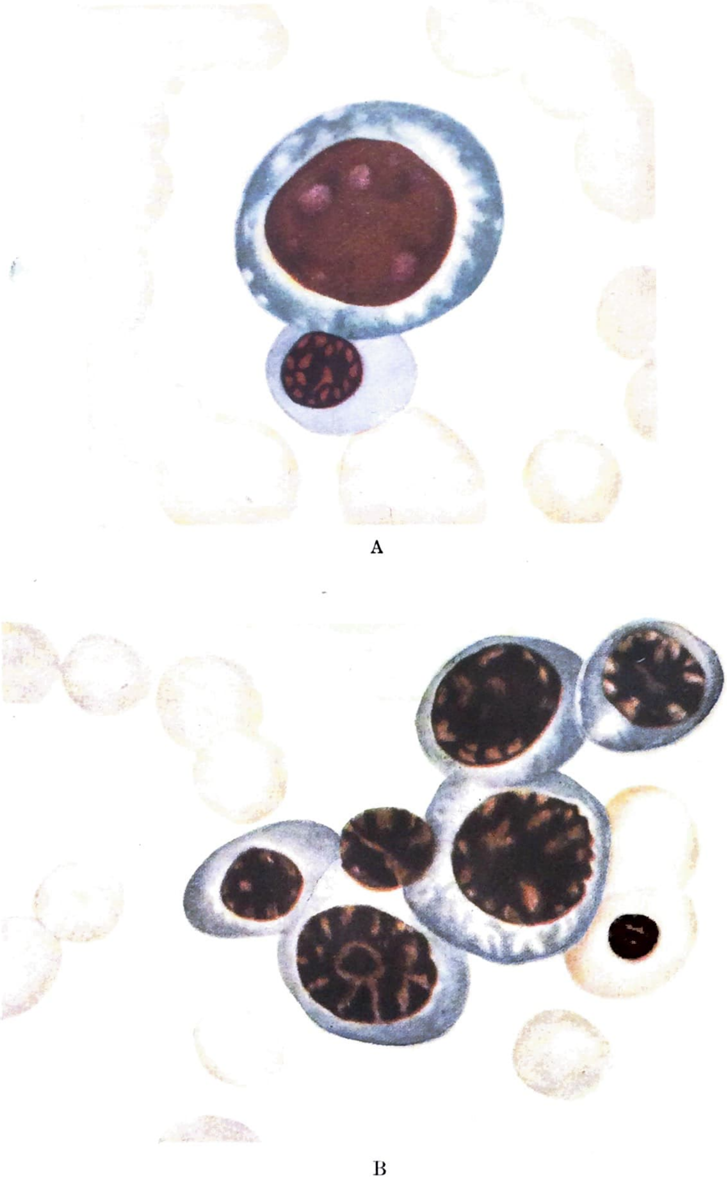


Fig. 145. — Seria eritrocitară normală.

A — **Proeritroblast şi eritroblast policromatofil.**

B — **Eritroblaşti bazofili şi eritroblast oxifil.**

Fig. 146. — Anemie megaloblastică Biermer. Sînge periferic : megalocitoză, anizocitoză.

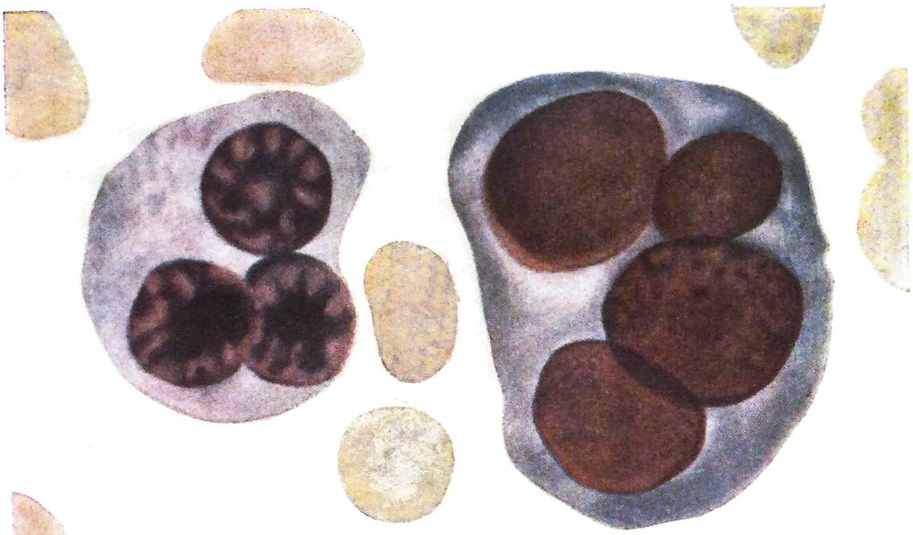


Fig. 147. — Eritremie : paraeritroblaști cu nuclei multipli.

roblaştii din măduvă. Granulele de fier se pot întîlni şi în celulele sistemului reticulo-histiocitar. Aceste granule reflectă prezenţa depunerii fierului sub formă trivalentă, ca hemosiderină. Cercetarea citochimică a hemosiderinei dă o imagine fidelă asupra stării depozitelor de fier din organism. Pentru detalii a se vedea capitolul despre anemii.

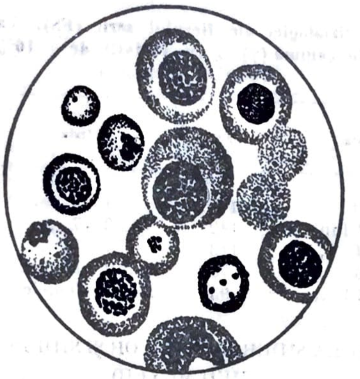


Fig. 144. — Siderocite, sideroblaşti.

Cu această metodă am obţinut cele mai bune rezultate. Pe lîngă fidelitatea rezultatelor, are şi marele avantaj de a da o imagine morfologică foarte precisă a elementelor colorate cu metoda obişnuită panoptică.

Cercetarea sideroblaştilor şi siderocitelor după fixare cu vapori de formol

Reactiv a = Ferocianură de K 0,1 g
Apă distilată ad 5 ml
Reactiv b = Acid clorhidric concentrat 37% puris. 0,30 ml.
Apă distilată ad 5 ml

La întrebuinţare reactivii a şi b se amestecă în părţi egale.

Tehnica :

1. fixare cu vapori de formol într-o cutie Petri, timp de 30 de minute.
2. Spălare cu apă bidistilată şi uscare.
3. Colorare timp de 30 de minute cu soluţia amestec a + b.
4. Spălare, timp de 20 de minute, cu apă de robinet în jet continuu.
5. Colorare cu fuxină sau eozină 1%, timp de 1—2 minute.

II. STUDIUL MORFOLOGIC AL SERIEI ERITROCITARE

La individul adult normal, celulele de origine a seriei eritrocitare, care duc în cele din urmă la eritrocit, se găsesc în măduva hematopoetică a oaselor denumită, după aspectul macroscopic, şi măduva roşie. Măduva hematopoetică este localizată în special în oasele plate şi în epifizele oaselor lungi.

La embrion sau în unele stări patologice, ficatul, splina, ganglionii şi alte organe pot prezenta o activitate eritropoetică.

Se utilizează des termenul de normoblaşti pentru a denumi seria eritroblastică normală. Este preferabil să se păstreze termenul general de eritroblast şi să se denumească celulele patologice ale seriei roşii cu termenii particulari (megaloblast etc.).

MORFOLOGIA SERIEI ERITROCITARE NORMALE (fig. 145)

Proeritroblastul este celula cap de serie, cu dimensiuni între 18 şi 25μ rotundă. Nucleul este rotund, voluminos, ocupînd opt zecimi din celulă; are structură reticulară uniformă, la întretăierea benzilor de cromatină culoarea fiind mai intensă. În ansamblu, nucleul este de culoare violet purpuriu închis şi are 1—2 nucleoli, puţin distincţi. Citoplasma este redusă la o bandă subţire, intens bazofilă, albastru foarte închis în coloraţia Giemsa, caracter foarte important. Citoplasma prezintă uneori o mică prelungire rotunjită într-o singură parte. Aspectul citoplasmei nu este omogen, ci prezintă părţi incolore. În jurul nucleului există un cerc cromofob, foarte subţire.

Macroblastul. După Naegeli, sub numele de macroblast se înţelege un eritroblast bazofil de talie mare; adăugarea acestui element în terminologie face să existe 5 stadii de dezvoltare eritroblastică, în mod normal. Din punct de vedere structural este identic cu eritroblastul bazofil.

Eritroblastul bazofil este o celulă de talie mai mică, în general de 16—18μ, dimensiunile nucleului sînt mai reduse, în favoarea protoplasmei, care este mai abundentă. Nucleul are bazicromatina grosolan dispusă, în grămezi colorate intens în violet-negru. Grămezile iau o formă pentagonală sau hexagonală, cu dimensiuni care ating uneori 2μ. Oxicromatina dispusă între grămezi este de culoare roz deschis. Foarte caracteristică pentru nucleul de eritroblast bazofil este prezenţa de oxicromatină dispusă radiar in cerc la periferia nucleului, in «spiţe de roată». Citoplasma este bazofilă, dar ceva mai deschisă şi relativ mai omogenă decît a proeritroblastului. Eritroblaştii bazofili se întîlnesc deseori îngrămădiţi, în cuiburi.

Eritroblastul policromatofil. Acest stadiu se caracterizează prin apariţia hemoglobinei în citoplasmă, căreia îi schimbă mult afinitatea tinctorială. Celula este rotundă, cu diametrul de aproximativ 9—12µ, cu nucleul cu atît mai redus cu cît celula este mai evoluată şi cu cromatina nucleară în grămezi groase, dispuse în aşa fel încît oxicromatina îşi păstrează desenul în spiţe de roată. Raportul nucleo-citoplasmatic diminuează, volumul nucleului ajungînd de aproximativ 25%. Citoplasma, care începe să se încarce cu hemoglobină, ia o serie de nuanţe care variază de la albastru-violaceu, la roz-cenuşiu.

Eritroblastul acidofil se mai numeşte şi eritroblast ortocromatofil. Celula este încărcată cu hemoglobină, astfel încît citoplasma este net acidofilă, aspect căruia îi datoreşte numele de eritrocit nucleat. Celula este rotundă, de dimensiuni aproape egale cu ale eritrocitului, măsurînd 8—9µ. Nucleul este mic şi citoplasma roz. Nucleul devine din ce în ce mai mic, iar pe măsură ce celula se mai maturizează, dispoziţia radiară a cromatinei se şterge, nucleul apărînd în cele din urmă ca o pată rotundă uniform colorată în violet închis (nucleu picnotic). Nucleul dispare prin expulzie sau prin carioliză, în mod normal, şi prin cariorexis în stări patologice.

Celulele seriei eritrocitare, de la proeritroblast pînă la eritroblastul acidofil, se găsesc în mod normal în măduvă. Cînd eritroblastul acidofil îşi pierde nucleul, devine reticulocit; acesta reprezintă forma de trecere în sîngele periferic care dă, mai departe, eritrocitul.

Reticulocitul. După pierderea nucleului, eritroblastul acidofil devine un reticulocit, un eritrocit tînăr care îşi păstrează încă mitocondriile şi substanţa bazofilă. Această substanţă bazofilă se pune în evidenţă prin coloraţii vitale cu albastru briliant crezil şi este denumită substanţă granulo-filamentoasă; este constituită din ribonucleoproteine, care dispar sub acţiunea ribonucleazei. Substanţa granulo-filamentoasă apare din stadiul de eritroblast acidofil în jurul nucleului, încă înainte de dispariţia acestuia.

În funcţie de dezvoltarea reţelei de substanţă granulo-filamentoasă se pot distinge 5 tipuri de reticulocite:

Tipul 0 : reţea perinucleară (în eritroblastul acidofil).
Tipul I : reţea în ghem strîns.
Tipul II : reţea laxă.
Tipul III : reţea fragmentată.
Tipul IV : resturi de substanţă, sub formă de 2—3 puncte izolate.

În mod normal tipul 0, I şi II se găsesc în măduvă; celelate pot fi găsite, atît în măduvă, cît şi în sîngele periferic. În sîngele periferic reticulocitele se găsesc în mod normal într-o proporţie de 5 pînă la $18^{0}/_{00}$ eritrocite. După 48 de ore reticulocitul se maturează şi trece în eritrocit, maturaţie ce se petrece în sîngele periferic şi se caracterizează morfologic prin pierderea substanţei granulo-filamentoase.

Afinităţi tinctoriale. Prin coloraţia vitală cu albastru briliant de crezil, eritrocitele şi fondul reticulocitelor apar colorate în albastru deschis spre verzui, iar substanţa granulo-filamentoasă se colorează în albastru intens.

Dimensiuni. Majoritatea reticulocitelor sînt ceva mai mari ca dimensiuni decît eritrocitele, fiind macrocite.

Acromoreticulocitul şi acromocitul. Printre elementele reticulocitare descrise mai sus se pot întîlni pe lamă unele celule cu citoplasmă palid-gălbuie, de dimensiuni mari, care pot atinge şi depăşi 10µ în diametru. Aceste celule conţin o reţea granulo-filamentoasă identică cu a reticulocitului. Sînt denumite acromoreticulocite, datorită afinităţii extrem de slabe a celulei pentru colorant. Astfel de elemente provin direct din eritroblastul bazofil, cînd acesta îşi pierde nucleul prea devreme, fără să treacă prin celelalte stadii de maturaţie. În cazul acesta, la coloraţia May-Grünwald-Giemsa rezultă un eritrocit bazofil, care la coloraţia vitală reprezintă acromoreticulocitul, celulă tînără foarte săracă în hemoglobină. Astfel de elemente se întîlnesc în reticulocitoze crescute (în regenerări medulare) şi au aceeaşi semnificaţie ca şi reticulocitele. Cînd acromoreticulocitul se maturează în sîngele periferic, prin pierderea substanţei granulo-filamentoase rezultă un acromocit care este un eritrocit slab încărcat cu hemoglobină şi de dimensiuni mai mari decît eritrocitul normal.

Eritrocitul (normocit sau hematie sau globul roşu). Eritrocitul este o celulă discoidală şi biconcavă, de culoare roz-intens (acidofil) la colorația panoptică, centrul celulei fiind mai puțin colorat (depresiune centrală). Diametrul eritrocitului variază între 7 și 8μ. Este o celulă lipsită de nucleu; citoplasama sa conține o concentrație mare de hemoglobină.

FIZIOLOGIA CELULELOR SERIEI ERITROCITARE

(generalități)

Viteza de maturație a celulelor seriei eritrocitare este rapidă: trecerea de la eritroblastul bazofil la eritrocit durează 25 de ore. În mod normal, proeritroblastul este o celulă de rezervă, care nu se divide decît în urma unor stimuli hematopoetici puternici. Eritropoeza este asigurată de diviziunea eritroblaștilor bazofili și policromatofili. Eritroblaștii cresc în măduvă în placarde, lipiți între ei de o substanță care dispare cînd nucleul se expulzează. Reticulocitele care rezultă părăsesc măduva și trec în circulație, unde se maturează în eritrocite. Se admite că sinusurile venoase ale măduvei reprezintă un sistem perfect închis, lipsit de comunicație directă cu parenchimul medular. Trecerea reticulocitelor în sinusurile medulare și deci în circulație se face prin efracția peretelui capilar, datorită presiunii exercitate de proliferarea celulelor seriei eritrocitare. Eritroblaștii fiind lipiți în placarde nu pot deci părăsi măduva în mod normal.

Reticulocitul se maturează în sîngele periferic după aproximativ 48 de ore, și trece în eritrocit. Sinteza hemoglobinei se face în condiții fiziologice nu numai în eritroblaști, ci ea continuă la reticulocit și, într-un grad redus, și la eritrocitul tînăr, un anumit timp. Sinteza hemoglobinei în celulele sîngelui periferic este mult crescută în anemii.

Cercetările efectuate cu tehnici multiple au stabilit că durata de viață a eritrocitelor este, la individul normal, în medie de 120 de zile.

PATOLOGIA SERIEI ERITROCITARE

Modificarea numărului de eritrocite. Tulburările cantitative domină patologia eritrocitară.

Sindromul anemic se caracterizează printr-o diminuare a volumului globular total, compensat parțial, în ceea ce privește masa sanguină totală, printr-o creștere a volumului plasmatic. Sîngele este mai diluat, mai fluid, mai puțin bogat în hemoglobină. Caracterul important este scăderea hemoglobinei, care de obicei merge paralel cu scăderea numărului de eritrocite. Cel mai frecvent se întîlnește o scădere mai accentuată a hemoglobinei decît a eritocitelor. Rar se poate întîlni un număr de eritrocite normal sau aproape normal, cu o scădere accentuată a hemoglobinei.

Sindromul poliglobulic se caracterizează prin creșterea volumului globular total, compensat parțial, în ceea ce privește masa sanguină totală, printr-o diminuare a volumului plasmatic. Sîngele este mai concentrat, mai vîscos, mai bogat în hemoglobină; numărul de eritrocite este crescut. Acest sindrom este opus anemiei din toate punctele de vedere.

Trecerea celulelor imature în sînge poate îmbrăca două aspecte.

Reticulocitoza. În mod normal, numărul de reticulocite variază între 5 și 18‰ eritrocite. Este preferabil să se utilizeze exprimarea în valori absolute, chiar dacă numărătoarea se face după un procedeu indirect. În valoare absolută, pentru 4 500 000 eritrocite/mm^3, numărul de reticulocite este cuprins între 20 000 și 80 000/mm^3. Creșterea numărului de reticulocite este un semn de regenerare crescută medulară și survine în: anemii hemolitice cronice sau acute, în anemii hemoragice acute sau cronice, după administrare de extracte hepatice, vitamină B_{12}, fier, vitamină C, hemoterapie. De asemenea, reticulocitele se găsesc crescute la gravidele izoimunizate (Kondi și Iacobescu). La nou-născut în mod fiziologic se găsește un număr crescut de reticulocite 40–45‰. Constatarea unei anemii fără creșterea numărului de reticulocite denotă o măduvă funcțional dificientă (aplazie, hipoplazie).

Eritroblastoza. Trecerea eritroblaștilor în sîngele periferic se poate întîlni în următoarele cazuri:

- Anemii hemolitice.
- Metastaze osoase canceroase.
- Leucoză acută.
- Metaplazie splenică.
- Boala Albers-Schönberg.
- Splenomegalie mieloidă cronică a adultului (osteomieloscleroză).
- Anemie acută posthemoragică.
- Hiposplenism.
- Eritroblastoză fiziologică a prematurilor sau nou-născuților; nou-născutul poate prezenta în mod normal 1–2% eritroblaști în sîngele periferic, iar copilul născut prematur poate prezenta la naștere un număr mai mare de eritroblaști la periferie.

— Eritremia acută sau cronică; eritroblaștii din eritremii sînt atipici.

PATOLOGIA ERITROCITULUI (fig. 148)

Anomalii de talie

Macrocitele sînt eritrocite mature de volum mai mare decît normal și cu diametrul între 8 și 10μ. Forma lor este normală, discoidală, iar raportul dintre grosimea celulei și diametrul ei este păstrat. Macrocitele coexistă în frotiu cu eritrocitele de talie normală și nu constituie ele singure tabloul sanguin. Macrocitul rezultă printr-o maturație viciată, în sensul proliferării homoplastice, pornind de la macroblast sau eritroblast bazofil, păstrîndu-se astfel dimensiunea mare. Macrocitoza se întîlnește în insuficiența hepatică.

Megalocitele sînt eritrocite mature care rezultă din megaloblast, în anemiile megaloblastice. Sînt celule voluminoase, cel mai adesea de formă eliptică, cu diametrul mare de 10, 12 sau 15μ, și diametrul mic de 7—8μ. Celula nu prezintă depresiune centrală sau, dacă aceasta există, este puțin accentuată. Megalocitele sînt bine colorate în roz, încărcătura lor în hemoglobină fiind completă. Volumul globular mediu este crescut, fiind cuprins între 110 și 140μ^3; grosimea este de asemenea ușor crescută : 2,2μ. Megalocitul rezultă dintr-o maturație inhibată a megaloblaștilor bazofili, care se maturează pînă la megalocit prin proliferare homoplas-

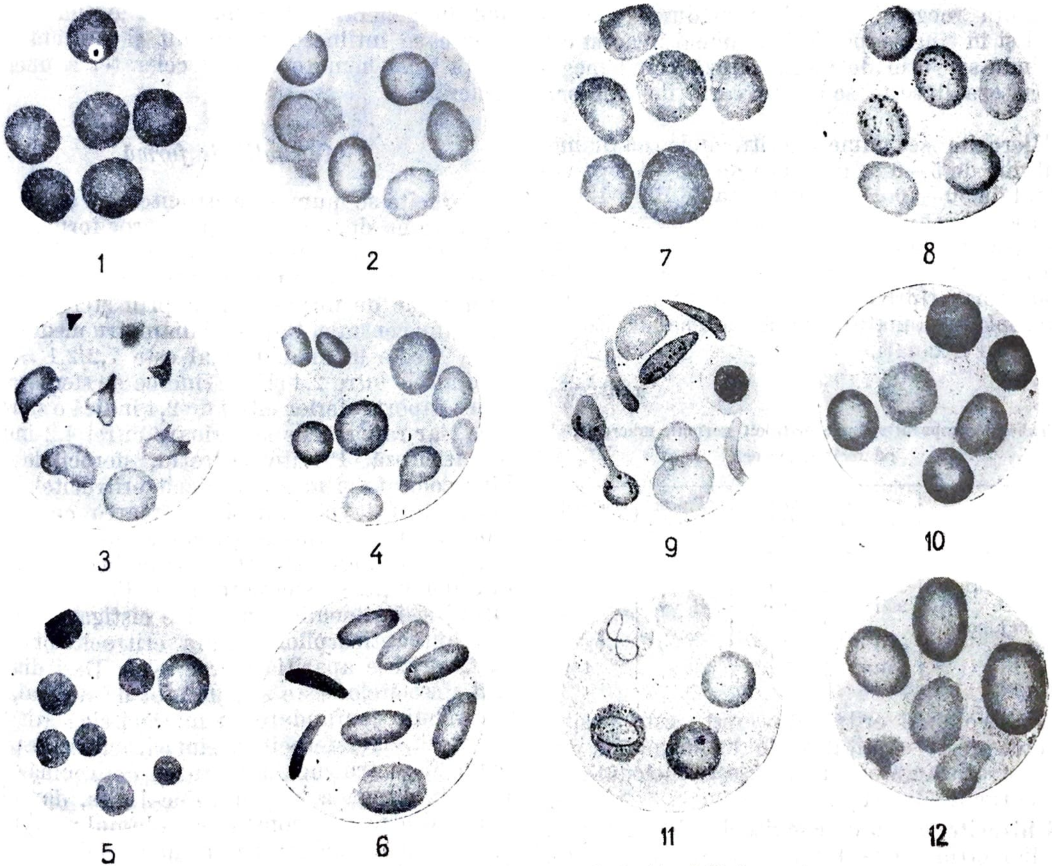


Fig. 148. — Eritrocitul normal și patologic (după Heilmeyer).
1 – normal; *2* – hipocromie; *3* – poikilocitoză; *4* – anizocitoză; *5* – microcitoză; *6* – ovalocitoză; *7* – macrocitoză; *8* – granulații bazofile; *9* – drepanocite și resturi nucleare; *10* – hipercromie; *11* – corpusculi Jolly și inele Cabot; *12* – megalocitoză.

tică, păstrîndu-se astfel dimensiunea mare a celulei.

Diagnosticul diferențial dintre megalocit și macrocit se bazează pe următoarele criterii: macrocitul are dimensiuni mai mici, diametrul mediu variind între 8 și 10 μ, pe cînd megalocitul are dimensiuni mai mari, cu diametrul mediu peste 10 μ; macrocitul prezintă depresiunea centrală, megalocitul poate fi lipsit de această depresiune și prezintă o nuanță roz mai accentuată. Criteriul hotărîtor, însă, este prezența megaloblastului în măduvă (sau rareori și în sîngele periferic), numai în acest caz putîndu-se vorbi de megalocitoză; cînd megaloblastoza lipsește se poate vorbi de macrocitoză.

Microcite se numesc eritrocitele cu diametrul mic de 5—6 μ, grosimea de 1,6—1,9 μ, volumul de 50—70 μ^3, și suprafața de 100—120μ^2. Microcitul este sărac în hemoglobină și pe frotiu prezintă de obicei o zonă mult mai clară în centru. Este elementul caracteristic anemiilor hipocrome feriprive. Provine printr-o proliferare heteroplastică, maturația făcîndu-se de la eritroblaștii evoluați.

TABELUL 74

Tabelul comparativ între eritrocit normal, macrocit, microcit și sferocit

	Diametru eritrocitar mediu	Volum eritrocitar mediu	Conținut eritrocitar mediu în Hb	Concentație eritrocitară medie în Hb.
Eritrocit normal	7,2 μ	90 μ^3	30 γγ	34 %
Macrocit	mărit	125 μ^3	46 γγ	34 %
Microcit hipocrom	scăzut	66 μ^3	20 γγ	28 %
Sferocit	scăzut	90 μ^3	30 γγ	34 %

Cînd volumul eritrocitar crește este posibil să crească și cantitatea de hemoglobină, dar concentrația acesteia nu depășește niciodată cifra normală de 34%.

Schizocite. Se numesc schizocite elemente mici cu diametrul de 2—4 μ, rotunde sau deformate, de obicei hipocrome. Se crede că schizocitele rezultă dintr-o fragmentare patologică a eritrocitelor. Se întîlnesc în anemiile grave, mai ales în cele hipocrome și în anemia mediteraneană. Elementele mici și rotunde se mai numesc microciclocite, numele de schizocite fiind dat formelor deformate, neregulate.

Anizocitoza. Se numește anizocitoză variația mare de talie între eritrocitele unui frotiu. Pe curba Price-Jones anizocitoza se reflectă printr-o bază mult lărgită, vîrful turtit și deviat la stînga sau la dreapta după cum predomină microcitele sau macrocitele. Anizocitoza se datorește prezenței de macrocite sau de megalocite alături de eritrocite normale ca talie sau subnormale. Anizocitoza se mai poate întîlni cînd sînt prezente eritrocite tinere (eritrocite bazofile sau reticulocite) care, datorită vîrstei lor, au totdeauna dimensiuni mai mari. Prezența acestor elemente imature se pune în evidență prin afinitatea lor tinctorială, ele fiind în general policromatofile. Astfel de elemente se întîlnesc în anemii și reflectă existența unei hematopoeze accelerate, a unei regenerări.

Anomalii de formă

Sferocite se numesc eritrocitele cu un diametru care nu depășește 6μ și a căror formă și colorabilitate sînt diferite față de eritrocitul normal. Sferocitele nu sînt biconcave, ci tind să se apropie de forma sferică prin ștergerea depresiunii centrale. Raportul diametru mediu/grosime medie în mod normal este 7,2/2,1 = 3,4, cu limitele între 2,4 și 4,2 (indice de sfericitate). Orice raport inferior cifrei de 2,4 indică o sferocitoză, iar raporturile superioare cifrei 4,2 indică o platicitoză. Privite pe frotiu, sferocitele sînt bine colorate și mai mici decît eritrocitele normale; totuși volumul și încărcarea cu hemoglobină sînt normale (normocrome). Sferocitele se întîlnesc în icterul hemolitic congenital, denumit și sferocitoză ereditară. Se pot întîlni și în anemii hemolitice cîștigate. Acțiunea autoanticorpilor asupra eritrocitelor pare să favorizeze apariția sferocitelor. Deși diametrul sferocitelor este scăzut față de normal, ele nu trebuie confundate cu microcitele: atît microcitoza, cît și sferocitoza sînt caracterizate printr-un diametru mediu scăzut și determină o deviere la stînga a curbei Price-Jones, dar diferența dintre ele constă în volumul mediu eritrocitar și în încărcarea în hemoglobină; astfel sferocitele au volum normal și încărcare în hemoglobină normală, pe cînd microcitele au volum mult scăzut și sînt hipocrome.

Platicite sau **leptocite** sînt eritrocite cu grosimea redusă și diametrul crescut, ceea ce dă un indice de sfericitate peste 4,2. Forma discoidală este păstrată și volumul eritrocitar neschimbat.

Celule în țintă sînt eritrocite caracterizate prin marginea și centrul bine colorate în roz.

între marginea și centrul celulei se află o zonă inelară clară, astfel încît celula are aspectul unui disc cu un punct central «în semn de tras la țintă». Astfel de celule se întîlnesc în special în anemia Cooley, dar și în diverse anemii hipocrome. Se întîlnesc și la indivizii normali splenectomizați.

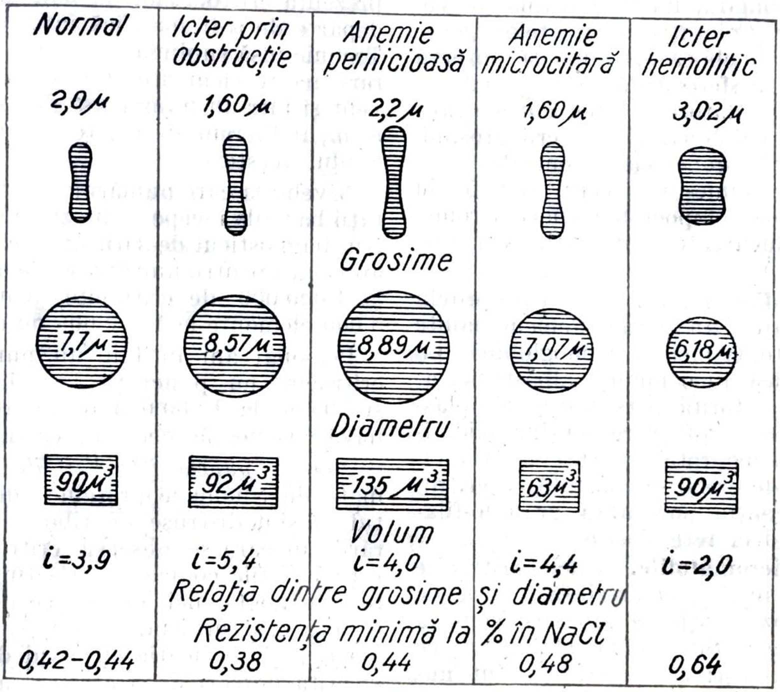

Normal
Icter prin obstrucție
Anemie pernicioasă
Anemie microcitară
Icter hemolitic
2,0μ
1,60μ
2,2μ
1,60μ
3,02μ
Grosime
7,7μ
8,57μ
8,89μ
7,07μ
6,18μ
Diametru
90μ³
92μ³
135 μ³
63μ³
90μ³
Volum
i=3,9
i=5,4
i=4,0
i=4,4
i=2,0
Relația dintre grosime și diametru
Rezistența minimă la % în NaCl
0,42-0,44
0,38
0,44
0,48
0,64

Fig. 149. — **Profiluri schematice ale eritrocitelor normale și în diverse anemii (după Heilmeyer).**

Corpi în semilună sînt artefacte care provin din eritrocite foarte labile, ce se distrug în timpul întinderii frotiului. Sînt slab colorate și mult mai lungi decît eritrocitele intacte, datorită destinderii lor. Se întîlnesc în anemii hemolitice prin intoxicații diverse, în paludism, în anemia Biermer.

Ovalocitele sînt eritrocite de formă ovală care se întîlnesc în ovalocitoza constituțională.

Drepanocite (*eritrocite falciforme*). Eritrocitele falciforme, cunoscute și sub numele de drepanocite, au formă de seceră, de virgulă sau uneori de bastonaș. Ele caracterizează hemoglobinoza S (drepanocitoza). Forma drepanocitară a eritrocitelor este mult favorizată dacă se lasă sîngele în cameră umedă mai multă vreme și în prezența de substanțe reductoare, ca cisteina sau metabisulfit de sodiu. Caracterul falciform este legat de prezența hemoglobinei S.

Poikilocitoza este deformarea pronunțată a eritrocitelor care iau formă de rachetă de tenis, de pară, de oval cu contur neregulat, dantelat etc. Ele sînt foarte diferite ca talie. Se întîlnesc în anemii pronunțate și grave și se consideră ca fiind rezultatul unei fragilități celulare crescute, influențate și de întinderea frotiului. Totuși, în multe cazuri examenul sîngelui proaspăt arată poikilocitoză; este vorba deci de o deformare preexistentă a formei.

Anomalii de colorabilitate

Eritrocitele hipocrome (hipocromie) sînt palide în comparație cu cele normale. Astfel de celule sînt slab încărcate cu hemoglobină și hipocromia este aproape totdeauna însoțită de microcitoză.

Anulocitul est un eritrocit hipocrom cu hemoglobina concentrată la periferie, încît centrul pare complet necolorat, ca lipsit de conţinut, dînd elementului aspectul unui inel.

Eritrocitele hipercrome. Noţiunea de hipercromie nu este reală, concentraţia eritrocitară medie în hemoglobină nedepăşind niciodată 34%. Noţiunea clasică de hipercromie, dedusă din valoarea globulară, nu ţine seamă de volumul eritrocitar. Coloraţia eritrocitelor poate fi mai intensă în unele cazuri, cum se observă în megalocitoză, în sferocitoză, în macrocitoză, dar aceasta nu se datoreşte unei concentraţii mai mari în hemoglobină, ci creşterii grosimii celulei şi dispariţiei zonei clare centrale.

Anizocromie se numeşte aspectul unui frotiu care conţine eritrocite hipocrome şi normocrome, deci eritrocite încărcate mai puţin sau mai mult cu hemoglobină.

Eritrocite bazofile sînt eritrocite care provin din eritroblaşti care şi-au pierdut nucleul înainte de încărcarea citoplasmei cu hemoglobină. La coloraţia panoptică au o nuanţă albăstruie, afinitate bazofilă datorită persistenţei citoplasmei eritroblastului bazofil care conţine acid ribonucleic (ribonucleoproteine). În coloraţia vitală cu albastru de crezil se constată că eritrocitele bazofile conţin substanţă granulo-filamentoasă, fiind deci reticulocite.

Eritrocite policromatofile. Unele eritrocite nu sînt colorate în roz, ci prezintă o serie de nuanţe, de la roz-cenuşiu la albastru cenuşiu şi albastru-violaceu. Sînt celule mai mari, ce provin din eritroblaşti care şi-au pierdut nucleul într-un stadiu mai tînăr. În felul acesta încărcarea lor în hemoglobină este mai mică decît în mod normal şi prezintă substanţa bazofilă în cantitate mai mică decît eritrocitul bazofil, fiind mai mature decît acestea. Coloraţia vitală arată că aceste eritrocite policromatofile sînt reticulocite. Atît eritrocitul bazofil, cît şi cel policromatofil se întîlnesc în anemii grave cu regenerare.

Corpusculi intraeritrocitari

Eritrocite cu punctaţii bazofile (granulaţii bazofile). Punctaţiile bazofile din eritrocite se prezintă sub formă de granule uşor inegale ca mărime, numeroase, răspîndite destul de uniform în celulă. Se colorează cu May-Grünwald-Giemsa în albastru-violaceu; mai net şi mai sigur apar cu coloraţia cu albastru de metilen, în nuanţă albastră-verzuie. Se întîlnesc în special în intoxicaţia cu plumb (saturnism), dar se pot întîlni şi în alte anemii, ca talasemia, anemii megaloblastice. Numărul lor este, de asemenea, crescut în intoxicaţiile cu benzen, oxid de carbon, anilină şi într-o serie de anemii cu regenerare medulară sporită. Punctaţiile bazofile se pot găsi în număr mic şi la persoanele normale şi cresc după splenectomie. Astfel, prezenţa eritrocitelor cu punctaţii bazofile este departe de a fi specifică intoxicaţiei saturnine. Trebuie însă subliniat că în nici o altă împrejurare aceste elemente nu se observă atît de frecvent şi într-un număr aşa de mare ca în saturnism, indiferent de existenţa unei anemii şi de gradul acesteia.

Nivelul la care numărul de eritrocite cu punctaţii bazofile începe să prezinte importanţă pentru diagnosticul de saturnism este foarte divers apreciat : pentru unii autori, de la 2 000 elemente la 1 000 000 de eritrocite, pentru alţii, de la 5 000 elemente la 1 000 000 de eritrocite.

Personal am întîlnit un număr crescut de eritrocite cu punctaţii bazofile, între 20 000 şi 30 000 la 1 000 000 de eritrocite, la o bolnavă cu anemie mediteraneană, formă minimă.

Natura punctaţiilor bazofile. Ele sînt formate de ribonucleoproteine; dovadă este faptul că sînt distruse de ribonuclează. Împrejurările în care se observă eritrocitele cu punctaţii bazofile coincid cu afecţiunile la care sinteza hemoglobinei nu se face normal, este blocată ca în saturnism, talasemie, anemie megaloblastică, intoxicaţie cu oxid de carbon. Este însoţită deseori de o creştere a protoporfirinei libere eritrocitare şi de o tulburare generală a metabolismului porfirinelor. S-a constatat o diferenţă mare între procentul de eritrocite cu punctaţii bazofile din sîngele venos faţă de sîngele capilar. După unii autori, în sîngele venos numărul acestor elemente ar fi de 3—4 ori mai mare decît în sîngele provenit din pulpa degetului. Astfel de punctaţii se pot întîlni nu numai în eritrocite, dar şi în eritroblaşti, concomitent.

Corpusculii Heinz (Ehrlich-Heinz) sînt granule mici, rotunde, puţine la număr, aşezate adesea spre periferia celulei, mai frecvent izolate, unice; pot fi însă şi multiple. Nu se colorează prin metoda pancromică, ci numai prin coloranţi vitali, ca albastru de Nil, violetul de metil, albastru briliant de crezil. Corpusculii Heinz se întîlnesc în intoxicaţiile methemoglobinizante cu fenilhidrazină, anilină, nitrobenzen, unele sulfamide (sulfhemoglobină). Este vorba de un derivat verdo-hemocromogen, care apare în prezenţa methemoglobinei sau sulfhemoglobinei (verdoglobine). Splenectomia favorizează creşterea numărului lor în caz de intoxicaţie.

Siderocite. Tehnicile histochimice pentru decelarea fierului pun în evidenţă granule albastre deschis, în număr de una pînă la şase, sau mai mult, reflectînd depunerea fierului sub formă trivalentă, ca hemosiderină. Cînd astfel de granule sînt prezente în eritrocit, celula se numeşte siderocit; cînd sînt prezente în eritroblaşti, se vorbeşte de sideroblaşti.

Prezenţa siderocitelor şi sideroblaştilor prezintă o deosebită importanţă în studiul şi diagnosticul anemiilor, fiind strîns legată de metabolismul fierului (a se vedea la capitolul despre anemii şi la studiul fierului).

Eritrocite cu diverse resturi nucleare sau citoplasmatice

Corpusculii Jolly (Howell-Jolly) sînt resturi de cromatină nucleară care dau reacţie Feulgen pozitivă. Se prezintă sub formă de corpusculi rotunzi, de aspect dens, picnotic şi cu afinitate tinctorială azurofilă; diametrul lor este de obicei de 1 μ, dar pot fi şi mai mari; se găsesc cîte unul într-un eritrocit, rareori doi sau trei. Eritrocitele cu corpusculi Jolly sînt mari. Corpusculii Jolly provin din picnoza cromozomilor care în cursul diviziunilor anormale rămîn în citoplasmă (cromozomi aberanţi). Se observă în anemiile grave şi mai ales în anemiile megaloblastice, în care se pot întîlni, atît în megalocite, cît şi în megaloblaşti, unul sau mai mulţi într-o celulă, de mărime variabilă, semn important în punerea diagnosticului de megaloblastoză.

Pulberea cromatiniană (granulaţiile eritrocitare azurofile) reprezintă tot resturi cromatiniene care rămîn în eritrocit; au aspectul de puncte fine răspîndite în celulă şi se întîlnesc în special în megaloblastoză.

Inelele Cabot sînt formaţiuni subţiri, filamentoase, în formă de inel, de cifră 8 etc., azurofile, colorabile cu coloraţia pancromică în roşu-violaceu sau roşu-deschis, dispuse la centrul sau la periferia eritrocitului. Originea lor este încă discutată. Reacţia Feulgen este negativă pentru inelele Cabot; totuşi mulţi autori le interpretează ca resturi nucleare. Unii autori consideră că originea inelelor Cabot este în fibrilele fusului mitotic, care au rămas neresorbite. Se întîlnesc în anemii foarte grave: anemiile din leucoze şi neoplasme, anemiile aplastice în ultima fază a evoluţiei.

Corpi endoglobulari de origine extrinsecă

Intraeritrocitar se pot găsi paraziţi, ca:

— hematozoarul palustru (a se vedea la ,,Parazitologie'') şi

— *Bartonella bacilliformis*, care provoacă boala denumită febra de Oroya; aceasta există endemic în unele zone din America de Sud şi se caracterizează prin anemie intensă. Parazitul se găseşte în eritrocite, colorat în roşu intens, ca puncte sferice mici sau în bastonaş.

SERIA ERITROCITARĂ PATOLOGICĂ

MORFOLOGIA SERIEI MEGALOBLASTICE

Celulele din seria megaloblastică se deosebesc de celulele normale ale seriei eritrocitare prin talia lor, dar mai ales prin modificările calitative ale structurii nucleare. Pentru acelaşi stadiu de maturaţie, megaloblaştii sînt celule mai mari decît celulele seriei normale. Citoplasma trece prin etape de maturaţie identice cu cele din eritropoeza normală, începînd cu o bazofilie puternică, apoi policromatofilie şi ortocromatofilie. Celula tînără, promegaloblastul, deşi are o structură nucleară mai fină decît aceea a proeritroblastului, totuşi se deosebeşte greu de proeritroblast. Cu cît celulele sînt mai tinere, cu atît seria megaloblastică se deosebeşte mai greu de seria eritroblastică normală. Celulele mai evoluate ale seriei megaloblastice prezintă un asincronism în dezvoltarea nucleului faţă de citoplasmă: citoplasma evoluează rapid, iar nucleul rămîne foarte tînăr, astfel că la grade identice de maturaţie a citoplasmei nucleii seriei megaloblastice apar totdeauna de structură imatură, laxă, mai fină decît cei din seria normală. La stadiul de policromatofilie şi mai ales la ortocromatofilie, nucleii megaloblaştilor au tendinţa de a prezenta tulburări care se manifestă prin polimorfism, ca nuclei bilobaţi, trilobaţi, şi prin apariţia de corpi Jolly de diferite mărimi, unici sau multipli.

Diferenţele dintre megaloblaşti şi celulele eritropoezei normale sînt şi mai nete în cursul mitozelor. Cromozomii eritroblaştilor normali sînt groşi şi scurţi, pe cînd cromozomii megaloblaştilor sînt deosebit de subţiri şi lungi şi cu unghiul mitotic mai ascuţit decît al eritroblaştilor. Mitozele megaloblaştilor prezintă anomalii de diviziune, sub formă de cromozomi aberanţi, picnotici, care sînt la originea fragmentării nucleului (cariorexis) şi a formării de corpi Jolly.

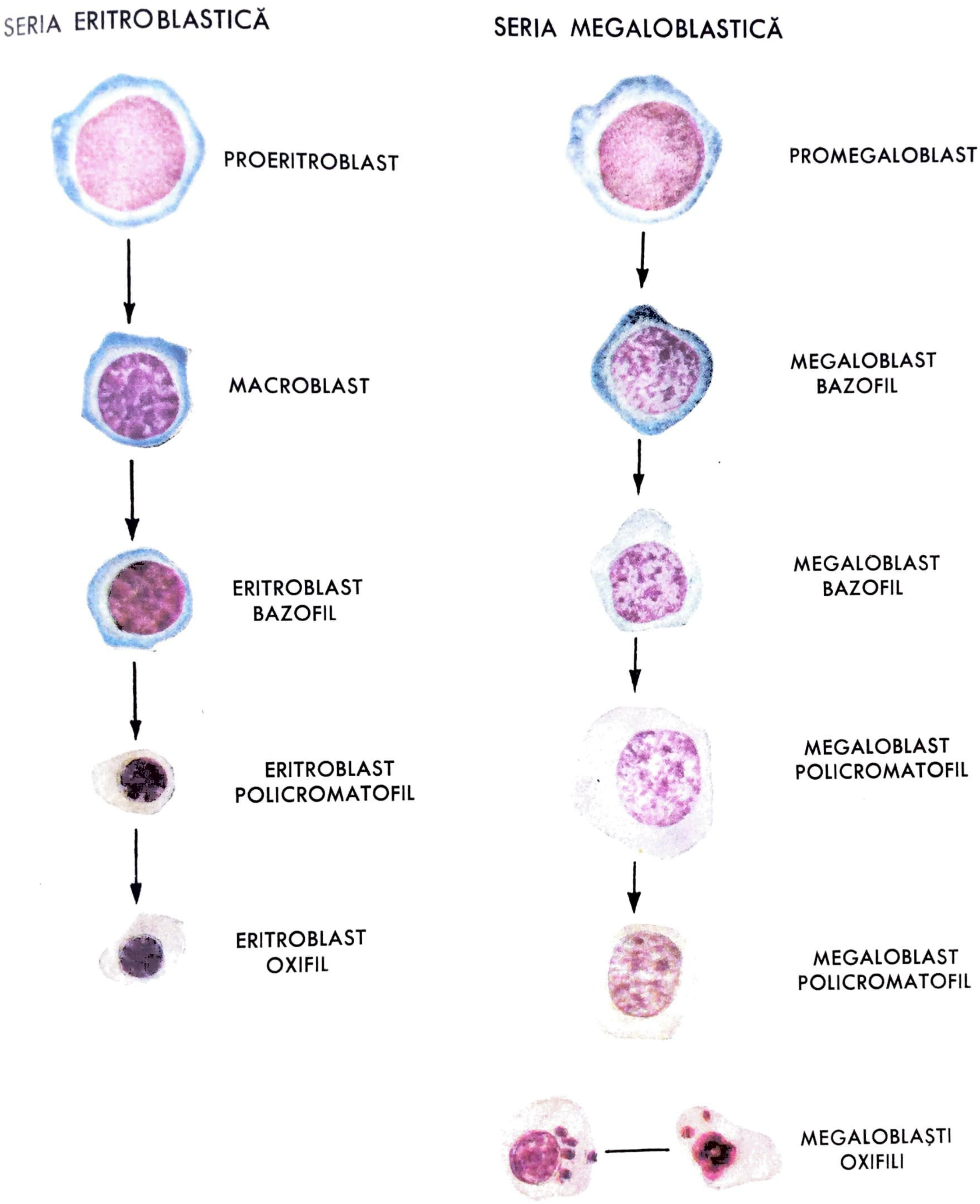

SERIA ERITROBLASTICĂ
SERIA MEGALOBLASTICĂ
PROERITROBLAST
PROMEGALOBLAST
MACROBLAST
MEGALOBLAST BAZOFIL
ERITROBLAST BAZOFIL
MEGALOBLAST BAZOFIL
ERITROBLAST POLICROMATOFIL
MEGALOBLAST POLICROMATOFIL
ERITROBLAST OXIFIL
MEGALOBLAST POLICROMATOFIL
MEGALOBLAŞTI OXIFILI

Fig. 151. — Seria eritroblastică şi seria megaloblastică.

Importante de menţionat sînt însă modificările celulare calitative caracteristice megaloblastozei; ele nu privesc numai eritropoeza, ci interesează într-o mare măsură şi granulopoeza şi trombopoeza. Astfel, alături de seria eritrocitară, contextul lamei privind celelalte serii este de mare ajutor în punerea diagnosticului de megaloblastoză.

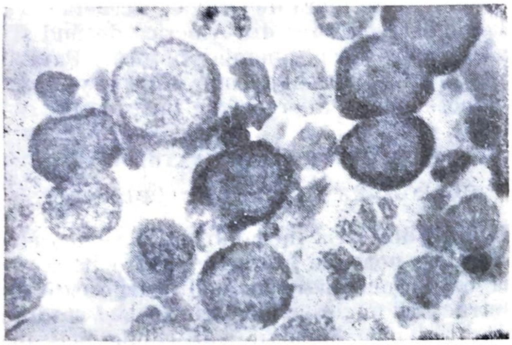


Fig. 150. — Anemie Biermer. Măduvă sternală: megaloblaşti.

În seria granulocitară, în măduvă apar gigantocite, care sînt metamielocite foarte mari, iar în sîngele periferic apar polimorfonucleare hipersegmentate, cu 5—6—7 nuclei (pleiocariocite). De asemenea, se întîlneşte un număr crescut de promielocite în măduvă.

În seria trombopoetică se observă deseori megacariocite cu nucleii hipersegmentaţi, trombopenie cu megatrombocite.

Toate aceste tulburări se explică prin lipsa factorului de maturaţie, care are repercusiuni generale asupra hematopoezei.

Promegaloblastul este o celulă de talie mare, 25—35μ, rotundă sau uşor ovalară, cu nucleu mare. Cromatina are aspect fin granulos, cu un reticul regulat, împletit astfel încît în ansamblu nucleul apare perlat. Există 1 pînă la 4 nucleoli slab coloraţi, cu diametrul de 1—2 μ. Citoplasma este albastră închis, cu unele zone incolore care corespund imaginilor negative ale mitocondriilor. Raportul nucleo-citoplasmatic este mult în favoarea nucleului.

Megaloblastul bazofil măsoară în medie 25 μ în diametru. În cursul evoluţiei reducerea nucleului este mai pronunţată decît reducerea citoplasmei. Cromatina este formată de granule fine şi numeroase: puncte mici de cromatină apar strîns şi omogen dispuse pe un fond mai clar, dînd aspectul de nucleu perlat. Uneori aceste granule se grupează formînd 1—2 cariozomi; existenţa acestor grupări de granule se întîlneşte frecvent şi este caracteristică nucleului de megaloblast. Citoplasma este albastră, cu pete albe. În acest stadiu se pot întîlni mitoze, unele cu tendinţă multipolară, inegale şi cu tulburări de repartiţie a cromozomilor (cromozomi aberanţi).

Megaloblastul policromatofil măsoară aproximativ 16 μ. Nucleul apare din ce în ce mai redus de volum, grămezile cromatiniene sînt mai mari şi net delimitate, alternînd cu porţiuni clare ale fondului nucleului. Pe măsura evoluţiei celulei aceste grămezi tind să se contopească; nucleul începe să se deformeze în acest stadiu şi apar corpi Jolly. Coloraţia citoplasmei trece de la albastru închis la violet, apoi la cenuşiu-verzui şi, mai tîrziu, în jurul nucleului coloraţia trece spre roz, ceea ce denotă apariţia hemoglobinei, care difuzează în toată citoplasma în stadiul următor de evoluţie a celulei. În acest stadiu de evoluţie a megaloblastului se constată uşor asincronismul de maturaţie nucleo-citoplasmatic; citoplasma este matură şi nucleul foarte tînăr, cu zone clare.

Megaloblastul acidofil este o celulă de 10—13 μ, rotundă sau eliptică. Citoplasma este roz, acidofilă, conţinînd hemoglobină. Nucleul poate fi redus, devenind picnotic, sau poate prezenta 3—4 grămezi de cromatină alternînd cu zone clare. Se întîlnesc deformaţii nucleare, corpi Jolly, descrişi la caracterele generale ale megaloblaştilor.

Megalocitul este ultimul stadiu de maturaţie a megaloblastului, fiind o celulă fără nucleu, cu diametrul mare de 10—12 sau chiar 15 μ, deci un eritrocit gigant. Pentru mai multe detalii se va vedea descrierea megalocitului la patologia eritrocitului (anomalii de talie).

Originea megaloblastului şi localizare. Originea megaloblastului este în sistemul reticulo-histiocitar. Se pot întîlni, astfel, formele de trecere de la celula reticulară spre promegaloblast, cu diferite stadii de diferenţiere, cu nucleii caracteristici care evoluează spre seria eritrocitară.

Diferitele stadii de megaloblaşti se întîlnesc de obicei în măduva hematogenă, dar în unele cazuri de megaloblastoză apar şi în sîngele periferic, mai ales formele mai mature, ca megaloblaşti policromatofili şi oxifili.

PARAERITROBLAŞTI

În eritremii se observă anomalii eritroblastice importante, întîlnite, atît în sînge, cît şi în măduvă, sau în organe ca splina sau ficatul. Aceste anomalii sînt datorite unei tulburări profunde a maturaţiei. Proeritroblaştii şi eritroblaştii bazofili sînt numeroşi, deseori în cuiburi largi; bazofilia lor este foarte pronunţată, mai pronunţată decît la celulele normale, citoplasma lor este neregulată, prezentînd deseori prelungiri filamentoase periferice. Cînd citoplasma devine policromatofilă, nucleul suferă o cariorexă foarte atipică : ia un aspect polisegmentat, sau apar nuclei multipli, numeroşi corpi Jolly. Maturaţia citoplasmei suferă şi ea, în acest stadiu constatîndu-se prezenţa de granulaţii bazofile sau azurofile sau plaje de citoplasmă heterocromă. Se întîlnesc des eritroblaşti giganţi, cu nucleul mare, sau cu mai mulţi nuclei cu caractere de atipie celulară (fig. 151) : citoplasmă hiperbazofilă, cu contur foarte neregulat, nucleul cu reţeaua de cromatină rău delimitată. Mitozele anormale, pluripolare, cu cromozomi fragmentaţi, se observă frecvent. Devierea spre stînga este pronunţată şi oprirea în maturaţie poate să meargă pînă la dispariţia formelor adulte de eritroblaşti, vorbindu-se în acest caz, de hiatus eritremic. Formele atipice cu 2—3 nuclei (poliploidie eritroblastică), cu nuclei bilobaţi şi trilobaţi şi cu nucleoli monstruoşi l-au determinat pe di Guglielmo să denumească aceste elemente paraeritroblaşti, aşa cum celulele atipice întîlnite în leucozele acute sînt denumite paramieloblaşti. Caracterele de monstruozitate, predominanţa formelor bazofile, metaplazia masivă în splină sînt elemente care le deosebesc de seria megaloblastică. Un simptom clinic important este prezenţa constantă a unei splenomegalii pronunţate.

III. AFECŢIUNILE SERIEI ERITROCITARE

ANEMIILE

Clasificare. A clasifica anemiile după un singur criteriu — morfologic, funcţional sau biochimic — înseamnează a privi problema unilateral, simplist. Modificările biologice în anemii sînt multiple şi numai un studiu multilateral poate preciza şi caracteriza o anemie. Astfel, o caracterizare morfologică — dimensională — trebuie sprijinită şi completată cu o caracterizare biochimică, citochimică şi, în cele din urmă, cu alte investigaţii biochimice sau serologice (imunologice), după caz. De asemenea, ancheta familială nu trebuie să lipsească pentru anemiile constituţionale. Procedîndu-se astfel se poate ajunge la un diagnostic etio-patogenic şi la un tratament corect. În mare, se disting 3 grupe de anemii :

— Anemii microcitare hipocrome.
— Anemii normocitare normocrome.
— Anemii macrocitare normocrome.

1. ANEMIILE MICROCITARE HIPOCROME

O anemie se numeşte hipocromă cînd scăderea hemoglobinei este mult mai accentuată decît scăderea numărului de eritrocite. Se caracterizează deci, prin scăderea conţinutului eritrocitar mediu în hemoglobină şi prin scăderea valorii globulare.

Din punct de vedere etio-patogenic se împart în :

— Anemia hipocromă feriprivă.
— Anemia hipocromă prin blocarea sintezei de hemoglobină.
— Anemia hipocromă prin carenţe multiple.

Anemiile hipocrome feriprive pot surveni prin :

Pierderi de sînge, prin hemoragii mici repetate ducînd la spolierea organismului de rezervele de fier. Se observă în caz de :

— hemoragii digestive : hernie diafragmatică, cancer gastric, esofagian, intestinal, rectal, duodenită hemoragică (ankilostoma), hemoroizi, ulcer gastroduodenal ;
— epistaxisuri repetate ;
— hemoragii genitale : polip, fibrom, metrite, cancer ;
— sindroame hemoragice : hemofilie, purpură, angiomatoză tip Rendu-Osler ;
— sarcini repetate cu lactaţie prelungită.

Carenţă de aport : la copii prematuri sau gemeni, în cazul unui aport insuficient prin laptele matern ; alimentaţie săracă în fier ; creşterea nevoilor de fier la copii.

Asimilarea defectuoasă a fierului prin lipsă de ionizare gastrică sau absorbţie intestinală defectuoasă, în :

— gastrectomie, gastro-enteroanastomoză, gastrite cu anaclorhidrie ;
— enterite rebele, dizenterie, sprue, boala celiacă.

Caracteristicile morfo-biologice ale acestor anemii sînt următoarele :
— Scăderea numărului de eritrocite.
— Hemoglobină scăzută.

— Valoarea globulară scăzută : 0,5—0,6.

— Microcitoză.

— Măduvă : hiperplazie eritroblastică cu predominanța eritroblaștilor bazofili.

— Volum eritrocitar mediu : scăzut.

— Conținut eritrocitar mediu în hemoglobină : scăzut.

— Concentrația eritrocitară medie în hemoglobină : scăzută.

— Fier seric : foarte mult scăzut.

— Capacitatea serului de fixare a fierului : foarte crescută.

— Protoporfirină liberă eritrocitară : crescută.

— Rezervele de fier din organism : scăzute.

— Sideroblaști : absenți.

— Fier în sistemul reticulo-histiocitar : absent.

— Proba hipersideremiei provocate : se constată o creștere marcată a fierului seric, înălțimea triunghiului curbei fiind crescută.

Anemii hipocrome prin blocarea sintezei de hemoglobină. În aceste cazuri, cantitatea de fier din organism rămîne nemodificată, dar există o repartizare anormală a fierului în diferitele compartimente (tulburare în metabolismul fierului).

1. *Anemii hipocrome prin blocarea sintezei de hemoglobină cu hiposideremie.* Se observă în : infecții cronice, neoplasme, uremie, insuficiențe endocrine (ovariană, tiroidiană, hipofizară).

Caractere biologice care o deosebesc de anemia feriprivă :

— Fier seric scăzut, dar mai puțin decît în anemia feriprivă.

— Protoporfirina liberă eritrocitară : crescută.

— Rezervele de fier în organism sînt nemodificate, însă sînt anormal repartizate ; există o depunere a fierului în sistemul reticulo-histiocitar.

— Sideroblaști : absenți.

— Fier în sistemul reticulo-histiocitar : prezent din abundență.

— Proba hipersideremiei provocate : negativă (nu apare hipersideremie provocată).

2. *Anemii hipocrome prin blocarea sintezei de hemoglobină cu hipersideremie.* Se observă în :

— talasemie, intoxicația cu plumb.

Caractere biologice distinctive sînt :

— Fier seric : crescut, uneori normal.

— Protoporfirină liberă eritrocitară : crescută.

— Rezervele de fier în organism sînt nemodificate, însă anormal repartizate : există o depunere a fierului în celulele seriei eritrocitare.

— Sideroblaști și siderocite = prezente din abundență.

— Fier în sistemul reticulo-histiocitar = absent sau foarte rar prezent (vezi tabelul 75 referitor la anemiile hipocrome).

Anemia hipocromă cu hiposideremie a adultului

Anemia hipocromă primitivă a adultului — anemia tip Hayem-Knud Faber — este o afecțiune foarte rară, cu caracter constituțional și familial. Ancheta etiologică negativă poate pune acest diagnostic rar.

Anemia hipocromă secundară cu hiposideremie a adultului

Semnele clinice sînt :

— paloare, dispnee, astenie, sufluri cardiace ;

— tulburări digestive : ragade bucale, atrofie linguală, disfagie, anorexie, atrofie gastrică ;

— tulburări cutaneo-mucoase : piele uscată, părul rar, uscat, deformații ale unghiilor.

Ancheta etiologică trebuie să cuprindă anamneza despre hemoragii :

—examene ginecologice, oto-rino-laringologice ;

— examene ale tubului digestiv : radiografie, radioscopie, rectoscopie, paraziți, aciditate gastrică ;

— studiul hemostazei.

Caracteristicile hematologice sînt următoarele :

— Anemie moderată : eritrocite 3 000 000/mm^3.

— Hipocromie cu V.G. = 0,5—0,6.

— Microcitoză.

— Hiperplazie eritroblastică medulară cu predominanța eritroblaștilor bazofili.

— Fier seric scăzut.

Anemia hipocromă cu hiposideremie a adolescenței

(cloroza pubertară)

Această anemie este rară în zilele noastre, datorită schimbărilor radicale ale condițiilor de viață și de igienă.

Se va cerceta etiologia anemiei hipocrome ; numai o anchetă negativă privitor la hemoragii, infecții sau intoxicații poate pune diagnosticul de cloroză.

TABELUL 75

Caracterele diferențiale în anemiile hipocrome

		Patogenie	Sideroblaști	Fier în SRH	Sideremie	Siderofilină	Protoporfirină liberă eritrocitară	Volum eritrocitar mediu. Conținut eritrocitar mediu în Hb· Concentrația eritrocitară medie în Hb
1. Anemie hipocromă feriprivă		Carență în fier	Absenți	Absent	Foarte scăzută	Crescută	Crescută	Scăzute
2. Anemie hipocromă prin blocarea sintezei de hemoglobină	Blocare Fe în S.R.H. (depunere în S.R.H.)	Infecții Neoplasme	Prezenți +	Prezent în cantitate mare +++	Scăzută	Scăzută	Crescută	Scăzute
	Blocarea Fe în eritroblaști (depunere în eritroblaști)	Talasemie Intoxicați cu plumb	Prezenți în cantitate mare +++	Prezent +	Crescută	Scăzută	Crescută	Scăzute

Anemia hipocromă cu hiposideremie a copilului

Apare între a 4-a și a 15-a lună de viață.

Condiții de apariție : de obicei este vorba de prematuri, de copii gemeni născuți de o mamă, la rîndul ei, anemică sau de copii hrăniți numai cu lapte timp îndelungat.

Factori favorizanți : infecții, tulburări digestive.

Semnele clinice : paloare, apatie, anorexie, uneori febră.

Hematologic se găsește :
- Scăderea numărului de eritrocite.
- Hipocromie.
- Microcitoză.
- Leucocitoză.
- Limfocitoză.
- Măduvă : hiperplazie eritroblastică cu predominanța eritroblaștilor bazofili ; uneori hiperplazie limfoidă asociată.
- Hiposideremie.

Pentru punerea diagnosticului se vor face următoarele investigații :
- dacă există prematuritate ;
- dacă este copil provenit din sarcină gemelară ;
- căutarea hemoragiilor tubului digestiv : hernie diafragmatică, malformații esofagiene, ulcerații, polipi, angiom, paraziți ;
- insuficiență de aport alimentar în fier, prin regim nepotrivit și asocierea unor carențe de vitamine C, B ;
- căutarea unor focare de infecție : oto-rino-laringologic în special ;
- eliminarea unei leucoze acute.

Anemia hipocromă a copilului poate să fie însoțită de o proliferare limfoidă a măduvei.

Anemia aplastică a copilului

(*Blackfan-Diamond*)

Este o afecțiune gravă, deseori fatală, dar uneori poate evolua spre vindecare. Interesează numai seria eritrocitară, cu o tulburare în proliferare și maturare. Anemia este simptomul esențial și deseori singurul ; este o anemie aregenerativă (reticulocitopenie).

Hematologic, în măduvă se găsește, fie o dispariție a eritroblaștilor, fie o oprire în maturația lor la stadiul de policromatofil sau acidofil.

Trombocitele și leucocitele sînt în număr normal.

Mecanismele care duc la anemie hipocromă sînt :

— hemoragii cronice	82 % din cazuri
— tulburări de absorbție și de aport	3 % din cazuri
— tulburări prin blocarea hemoglobinei	2 % din cazuri
— depuneri de fier în sistemul reticulo-histiocitar	13 % din cazuri

2. ANEMIILE NORMOCITARE NORMOCROME

(*Anemiile hemolitice*)

Clasificarea anemiilor hemolitice

A. *Anemii hemolitice prin cauze eritrocitare.*

1. Constituționale
   - *a*) Boala Minkowski-Chauffard.
   - *b*) Eliptocitoza.

c) Hemoglobinozele
  - talasemia;
  - drepanocitoza;
  - hemoglobinoza C,D, E etc.

2. Cîştigate — Hemoglobinuria paroxistică nocturnă.

B. *Anemii hemolitice prin cauze extraeritrocitare*

1. Imunologice (vezi capitolul de imuno-hematologie)
   - *a*) Izoanticorpi: boala hemolitică a nou-născutului, accidente hemotransfuzionale.
   - *b*) Autoanticorpi (vezi capitolul de imuno-hematologie).
2. Substanţe toxice: agenţi chimici.
3. Agenţi fizici.
4. Agenţi medicamentoşi.
5. Toxine hemolitice.
6. Produse vegetale.
7. Agenţi infecţioşi
8. Paraziţi.

C. *Anemii hemolitice prin cauze mixte, eritrocitare şi extraeritrocitare: deficienţa în glucoză-6- fosfat dehidrogenază.*

Semne comune tuturor anemiilor hemolitice

În condiţiile fiziologice există un echilibru între cantitatea de eritrocite produsă şi eliberată în circulaţie de către sistemul hematopoetic şi cantitatea de eritrocite distrusă.

În mod normal durata de viaţă a eritrocitelor este de 120 de zile. Sub acţiunea factorilor nocivi, fie eritrocitari, fie extraeritrocitari, durata de viaţă a lor este scurtată, distrugerea eritrocitară depăşeşte limitele normale şi în acest caz se instalează un sindrom hemolitic. Cu cît durata de viaţă a eritrocitelor este mai scăzută, cu atît distrugerea lor va fi mai exagerată. O distrugere eritrocitară de proporţii mici, în anumite limite, nu este însoţită de anemie deoarece măduva hematopoetică are o mare capacitate de regenerare care compensează uşor distrugerea. În astfel de cazuri anemia poate lipsi sau uneori se poate găsi chiar o uşoară poliglobulie printr-o excitare medulară şi o hiperplazie eritroblastică compensatoare.

✓ Un sindrom hemolitic compensat fără anemie se pune în evidenţă prin prezenţa semnelor de distrugere eritrocitară exagerată (hiperbilirubinemie indirectă crescută etc.) şi prin semnele de regenerare eritrocitară exagerată (numărul de reticulocite crescute etc.).

Măduva hematopoetică prezintă o capacitate compensatoare mare ce poate face faţă la distrugeri eritrocitare de 6—7 ori mai pronunţate decît cifrele fiziologice. Cînd distrugerea depăşeşte capacitatea compensatoare a măduvei, atunci se instalează anemia, sindromul hemolitic devine decompensat. Viaţa eritrocitelor este atunci scurtată sub 20 de zile şi anemia este cu atît mai pronunţată cu cît distrugerea este mai intensă şi viaţa eritrocitelor mai scurtă.

Dacă distrugerea eritrocitară continuă, cu timpul măduva suprasolicitată începe să cedeze şi din hiperplazică devine hipoplazică şi aplazică lăsînd loc la o anemie gravă aregenerativă.

Semnele de distrugere eritrocitară exagerată sînt:

Semne biologice:

— Hiperbilirubinemie indirectă: 100—500 mg $^{0}/_{00}$ (normal 5 mg).

— Icterul clinic apare la 60—80 mg $^{0}/_{00}$.

— Creşterea stercobilinogenului: 300—400 mg în 24 de ore; scaunele sînt hiperpigmentate.

— Urobilinurie: cînd creşte bilirubina directă (glicuronoconjugată).

— Hiperhemoglobinemie şi hemoglobinurie: apar în cazul hemolizelor intravasculare rapide şi masive. Hemoglobinemia normală: 40 mg $^{0}/_{00}$ în ser; hemoglobina trece în urină cînd concentraţia ei depăşeşte 1 500 mg $^{0}/_{00}$.

— Hemosiderinurie: caracterizează hemoglobinemiile permanente. Ea constituie o formă de depunere a fierului la nivelul celulelor renale; fierul este apoi excretat sub această formă prin celulele tubulare descuamate: sideroză.

— Methemalbumina: apare în hemolizele vasculare rapide şi masive, cînd rezultă o formă oxidată a hemului (protoporfirină + Fe^{+++}), care se leagă de albumina serică. Prezintă interes deoarece persistă multe ore după dispariţia hemoglobinemiei.

Semne hematologice:

— Anemie.

— Sferocitoză.

— Schizocite.

— Eritrofagocitoză.

— Durata de viaţă a eritrocitelor scăzută.

Semne de regenerare eritrocitară exagerată sînt:

— Creşterea reticulocitelor: 100—900 $^{0}/_{00}$.

— Eritroblastemie.

— Policromatofilie.

— Hiperleucocitoză şi trombocitoză.

— Hiperplazie eritroblastică medulară: predomină eritroblaştii oxifili, raportul granuloeritroblastic scade la 1—0,5, în loc de 3.

Alte teste de laborator:

— Rezistenţa osmotică.

— Cercetarea anticorpilor antieritrocitari.
— Studiul electroforetic al hemoglobinei.
— Cercetarea hemoglobinei alcalinorezistente.
— Sideremia crescută.

Ancheta familială pentru anemiile constituționale este obligatorie.

Distrugerea eritrocitară exagerată se datorește: *a*) unei proaste calități a eritrocitelor datorite unui viciu biologic sau *b*) acțiunii nocive a substanțelor extraeritrocitare care acționează asupra unor eritrocite normale.

Metoda transfuziilor încrucișate permite diferențierea netă a acestor două tipuri de stări hemolitice.

— Cînd eritrocitele sînt anormale, durata lor de viață este scurtată, atît în organismul respectiv, cît și cînd sînt transfuzate în organismul unui individ normal. Eritrocitele normale transfuzate la bolnav au o durată de viață normală.

— Cînd anomalia este extraglobulară, eritrocitele bolnavului au o durată de viață scurtată în propriul organism, dar durata lor de viață este normală cînd sînt transfuzate la un individ normal. Eritrocitele normale transfuzate la bolnav au o durată de viață scurtată.

Astfel anemiile hemolitice se împart în trei categorii:

1. Unele sînt consecința unei alterări primitive a eritrocitului. De cele mai deseori este vorba de o distrofie sau malformație eritrocitară constituțională. Malformația eritrocitară poate ține de o tulburare a hemoglobinei sau este independentă de hemoglobină. În prima categorie intră diversele hemoglobinoze și talasemia; în a doua categorie intră boala Minkowski-Chauffard sau sferocitoza ereditară. Hemoglobinuria paroxistică nocturnă este probabil datorită unei tulburări eritrocitare.

2. În a doua categorie, cauza este extraeritrocitară. Eritrocitul poate fi distrus prin izoanticorpi (boala hemolitică a nou-născutului), prin autoanticorpi, prin substanțe toxice, prin toxine microbiene, prin virusuri sau prin paraziți.

3. A treia categorie, datorită unor cauze mixte eritrocitare și extraeritrocitare: deficiența în G — 6 — P.D.

Boala Minkowski-Chauffard

(Icter hemolitic congenital — Sferocitoză ereditară)

Boală ereditară și familială care se manifestă între 5 și 12 ani, rar mai devreme, excepțional la naștere, uneori mai tîrziu, la adult.

Elementele de diagnostic sînt următoarele:

Elemente clinice:

— Triada icter, paloare, splenomegalie moderată.
— Alte tulburări: modificări osoase (craniu în turn, osteoporoză).

Elemente hematologice:

— Anemie moderată normocromă.
— Reticulocitoză ridicată.
— Hiperplazie eritroblastică în măduvă.
— Sferocitoză.
— Diametrul mediu eritrocitar scăzut $= 6\mu$.
— Curba Price-Jones deviată la stînga.
— Diminuarea rezistenței osmotice.
— Studiul imunohematologic negativ (absență de anticorpi).
— Constituție normală a hemoglobinei.

Ancheta familială: sindroame identice la părinți sau colaterali.

Diagnosticul diferențial se face pentru:

1. Stabilirea existenței unei stări hemolitice pentru eliminarea icterelor prin hepatită sau mecanice.

2. Eliminarea altor anemii hemolitice constituționale:

— hemoglobinozele; studiul hemoglobinei;
— eliptocitoza.

3. Diferențierea de anemiile hemolitice prin izo- sau autoanticorpi; în aceste anemii examenul imunologic este pozitiv.

4. De anemiile hemolitice prin toxine hemolitice.

5. De anemiile hemolitice prin infecții.

Eliptocitoza constituțională

Caracteristicile sale sînt:

— Paloare sau, uneori, nici un semn clinic.
— Anemie, care uneori poate lipsi.
— Reticulocitoză (poate lipsi uneori).
— Eliptocitoză.
— Splenomegalia este inconstantă.
— Sindrom analog la părinți (caracter familial ereditar).

Hemoglobinozele

Hemoglobinozele reprezintă afecțiuni ereditare caracterizate prin prezența uneia sau mai multor hemoglobine anormale.

Hemoglobina anormală cel mai frecvent întîlnită în regiunile noastre este hemoglobina F, zisă fetală sau alcalinorezistentă, caracteristică talasemiei. Hemoglobina F este considerată ca o hemoglobină normală în majoritatea publicațiilor. Totuși, lucrări recente au arătat că hemoglobina alcalinorezistentă din talasemie este deosebită prin anumite proprietăți de hemoglobina fetală, în special prin antigenitatea ei.

Dintre celelalte hemoglobine anormale, cea mai importantă este hemoglobina S, care caracterizează drepanocitoza.

Hemoglobinozele datorite prezenței altor hemoglobine anormale — C, D, E, H, I, J, K— sînt rare și încă în studiu.

Hemoglobinozele se prezintă sub următoarele forme :

— Forme de boală manifestă, cu tulburări clinice grave : indivizi homozigoți pentru o hemoglobină anormală, moștenind boala de la părinții care au amîndoi aceeași hemoglobină anormală în eritrocite.

— Forme latente descoperite la un examen sistematic : indivizi heterozigoți pentru o hemoglobină anormală, moștenind boala de la unul din părinți, celălalt fiind sănătos.

— Indivizi cu dublu heterozigotism, avînd două hemoglobine anormale, moștenite de la părinți, ambii cu cîte o hemoglobină anormală.

Nomenclatura cea mai simplă pentru a exprima aceste forme de boală este următoarea :

Exemplu pentru drepanocitoză (Hb S) :

— pentru indivizii homozigoți, litera hemoglobinei respective se scrie de două ori : SS;

— pentru indivizii heterozigoți se scrie litera hemoglobinei anormale S și litera hemoglobinei normale A, adică AS;

— pentru indivizii cu dublu heterozigotism, de exemplu S și C, se scriu ambele litere, adică SC.

Hemoglobinozele fac parte din grupul anemiilor hemolitice constituționale de cauză eritrocitară, cu prezența unei hemoglobine anormale.

Printre hemoglobinoze se pot distinge :

— Talasemia (hemoglobină F).

— Drepanocitoza (hemoglobină S).

— Hemoglobinoza C.

— Hemoglobinoze foarte rare : D, E, H etc.

Diagnosticul biologic al hemoglobinozelor necesită 3 serii de examene : studiul eritrocitelor, determinarea naturii hemoglobinei și ancheta familială.

Studiul electroforetic comparativ al diferitelor hemoglobine

Electroforeza pe hîrtie nu permite determinarea mobilităților electroforetice absolute ; este, deci, indispensabil de a compara mobilitatea hemoglobinei de cercetat cu aceea a uneia sau mai multor hemoglobine cunoscute.

Electroforeza pe hîrtie, în mediu alcalin, permite o bună separare a majorității hemoglobinelor, care migrează în ordinea mobilităților anodice descrescînde :

$$-C < E < SD < G < F < A +$$

Pentru a deosebi hemoglobina F de hemoglobina G, care migrează foarte aproape, se procedează la determinarea rezistenței față de alcali, F fiind cea rezistentă.

La fel se procedează pentru a deosebi F de A.

Hemoglobina S se poate deosebi de D care migrează foarte aproape prin proba solubilității și prin cercetarea eritrocitelor falciforme.

Talasemia: este o anemie hemolitică hipocromă cu hipersideremie, caracterizată prin prezența hemoglobinei alcalinorezistente (F) în eritrocitele bolnavului. Se întîlnește în special în bazinul mediteranean, dar și în multe alte zone geografice de pe glob, în America și Asia.

Dintre hemoglobinoze, talasemia este singura care prezintă o hipocromie manifestă și o lipsă de utilizare a fierului pentru sinteza hemoglobinei. Scăderea cantitativă a sintezei *in vitro* a hemului în cazul talasemiei majore a fost explicată printr-o scădere relativă a producției de protoporfirină asociată de o blocare parțială a unirii protoporfirinei cu fierul, protoporfirina liberă eritrocitară fiind crescută. Fierul seric este crescut și se găsesc rezerve crescute de fier în eritroblaști și eritrocite (sideroblaști și siderocite în număr mare).

Se descriu mai multe forme de talasemie:

Talasemia majoră sau *anemia Cooley*, forma homozigotă de boală, ambii părinți fiind atinși, este o formă gravă, incompatibilă cu viața.

Talasemia minoră sau *boala Rietti-Greppi-Michelli*, forma heterozigotă, unul din părinți fiind atins, are evoluție lentă, benignă.

Talasemia minimă sau *boala Silvestroni și Bianco*, formă heterozigotă, are evoluție latentă benignă.

Talasemia majoră se caracterizează clinic prin tulburări precoce, iar diagnosticul se pune în primii ani ai copilăriei. Copilul este palid, uneori subicteric, deseori subfebril. Prezintă o splină voluminoasă, mobilă, nedureroasă; ficatul de asemenea este mărit. Se observă modificări osoase evidente : aspect mongoloid, cap mare, baza craniului mare.

În talasemie procentul de hemoglobină alcalinorezistentă variază în timp și după anotimp. Este important de menționat că în cazurile de talasemie minimă aceste variații pot să ducă, fie la creșterea, fie la scăderea pînă la dispariția temporară a hemoglobinei alcalinorezistente, fapt care implică cercetarea periodică a bolnavului suspect. Astfel, un caz de talasemie minimă studiat de noi a avut de 3 ori succesiv hemoglobina alcalinorezistentă absentă, pentru ca să se constate, după 3 luni, la un nou examen, apariția unei proporții de 6,2% hemoglobină alcalinorezistentă ceea ce a confirmat definitiv diagnosticul.

TABELUL 75 bis

Cele 3 forme de talasemie, comparativ

	Talasemie majoră	Talasemie minoră	Talasemie minimă
Părinții	Ambii atinși (homozigot)	Unul atins (heterozigot)	Unul atins (heterozigot)
Clinic	Paloare Subicter Splenomegalie Modificări osoase Facies mongoloid Stare generală mediocră	Paloare moderată Subicter Splenomegalie Modificări osoase discrete Stare generală destul de bună	Lipsesc
Hematologic	Anemie accentuată Eritroblastemie Hiperbilirubinemie Leptocite Microcite Rezistență globulară crescută Hipocromie Hipersideremie Hemoglobina F = 90%	Anemie moderată Eritroblastoză inconstantă Hiperbilirubinemie Leptocite Microcite Rezistență globulară crescută Hipocromie Hipersideremie Hb F = 30%	Număr de eritrocite normal Bilirubină normală Leptocite Microcite Rezistența globulară crescută Hipersideremie Hb F = 5%
Evoluție	Fatală	Lentă benignă	Latentă benignă

Anemii hipocrome hipersideremice netalasemice

Această grupă de anemii prezintă multe caractere comune cu talasemia, se întîlnește aceeași hipocromie, aceleași modificări morfologice eritrocitare, aceeași rezistență osmotică eritrocitară. Tulburările metabolismului fierului sînt asemănătoare. Există totuși cîteva caractere care tind să despartă această grupă de talasemie. Astfel în aceste anemii hipocrome cu hipersideremie nu se găsește o hemoglobină anormală, hemoglobina alcalino-rezistentă este absentă. Modul de transmitere ereditară este diferit de cel întîlnit în talasemie: numai cei de sex masculin sînt atinși de forme grave, sexul feminin prezintă forme ușoare clinic inaparente cu anomalii hematologice minore. Aceste anemii răspund bine la un tratament cu piridoxină (Vitamină B_6).

Drepanocitoza este legată de anomalia constituțională a hemoglobinei S. Se observă la negrii din America, Africa.

Forma latentă — hemoglobinoza AS:

— Fără manifestări clinice.

— Prezența de hemoglobină A și S (Hb. S 20—45%).

— Numărul de eritrocite: normal.

— Prezența de eritrocite falciforme (10—40%).

— Se semnalează hematurii spontane frecvente, riscul infarctului splenic și uneori tulburări psihice în timpul zborurilor la altitudine mare.

— Prognostic: bun.

— Hemoglobina S se găsește la unul din părinți.

Forma manifestă — hemoglobinoza SS:

— Clinic: paloare, icter, splenomegalie, tromboze, dureri și leziuni osoase, tulburări cardiace, ulcere pe gambe.

— Prezența de hemoglobină S (60—99%).

— Anemie.

— Eritrocite falciforme: 40—100%.

— Prognostic sever: moartea survine înainte de vîrsta de 10 ani în majoritatea cazurilor.

— Hemoglobina S se găsește la ambii părinți.

Hemoglobinuria paroxistică nocturnă

(Boala Marchiafava-Micheli)

— Crizele hemoglobinurice survin noaptea; urinile sînt clare ziua, roșii noaptea și spre dimineață. Crizele hemoglobinurice sînt favorizate de infecții, transfuzii de sînge, administrare de fier.

— În afara crizelor se constată:

— Hemosiderinurie permanentă.

— Anemie hemolitică cronică importantă.

— Leucopenie, neutropenie, trombopenie.

— Eritrocitele sînt anormale: durata lor de viață, cînd sînt transfuzate la un individ sănătos, este scurtă. Eritrocitele normale au o supraviețuire normală în organismul bolnavului.

— Rolul properdinei în hemoliza eritrocitelor bolnavilor de hemoglobinemie nocturnă paroxistică:

— properdina singură nu produce hemoliza;

— un ser lipsit de complement și îmbogățit în properdină nu este hemolitic;

— un ser lipsit de ionii de Mg^{++}, dar păstrînd factorul C'_3 (factorul al treilea al complementului) și properdina, de asemenea nu este hemolitic. Pentru ca să se producă hemoliza trebuie să fie prezente cele 3 elemente: C'_3, Mg^{++}, properdina și un pH de 6,8.

— Proba hemolizei la cald: eritrocitele se hemolizează după o oră de incubație la 37° în serul propriu sau într-un ser normal izogrup.

— Reacția Ham: pozitivă.

— Reacția Crosby: pozitivă.

Anemii hemolitice prin agenți fizici, chimici, infecțioși

a) *Agenți fizici*: arsuri grave.

b) *Agenți chimici direct hemolitici*: hidrogen arseniat, fenilhidrazină, naftalină, benzen, β-naftol.

c) *Agenți methemoglobinizanți*: nitriți și nitrați, clorați, hidrocarburi aromatice.

— Derivați nitrați: nitrobenzen, nitrotoluen.

— Derivați aminați: anilină, acetanilidă.

— Derivați de hidrazină: fenilhidrazină, acetilfenil-hidrazină.

— Derivați sulfamidați: sulfanilamidă, sulfapiridină.

— Cianoză enterogenă: de origine endogenă, datorită unui bacil (nitrozobacil) din intestin.

TABELUL 76

Diagnostic diferențial între hemoglobinuria paroxistică nocturnă și hemoglobinuria paroxistică à frigore

	Hemoglobinuria paroxistică à *frigore*	Hemoglobinuria nocturnă paroxistică
Etiologie	În general necunoscută, uneori sifilis	Cauză necunoscută
Tulburare fundamentală	Cauze plasmatice serice: hemolizine bifazice	Cauză eritrocitară. Hemoliză acidă
Criză hemoglobinurică	Provocată prin frig	Nocturnă
Între crize	Clinic latentă	Anemie, icter hemolitic, hemosiderinurie
Evoluție	Variabilă, în funcție de frecvența crizelor; rar gravă	Variabilă. Agravată prin transfuzii, fier, splenectomie Ameliorată prin transfuzii de eritrocite spălate

d) *Agenți chimici cu acțiune complexă*: plumbul cu acțiune blocantă asupra sintezei hemoglobinei. Punctațiile bazofile ar fi determinate de o leziune a substanței bazofile a eritroblastului și reticulocitului.

e) *Hipersensibilitate hemolitică* față de agenți chimici: sulfamide, chinină, plasmochin etc. Indivizii susceptibili de a răspunde printr-o hemoliză acută la absorbția unui mare număr de medicamente (sulfamide în special etc.) au un deficit în anumite enzime eritrocitare, ca glucoză-6-fosfat-dehidrogenaza. Această anomalie biochimică a eritrocitelor este responsabilă de hemoliză și punerea ei în evidență poate confirma diagnosticul.

f) *Toxine hemolitice*: venin de șarpe, ciuperci otrăvitoare.

g) *Produse vegetale*. Favismul este un sindrom hemolitic acut cu hemoglobinurie, determinat de *Vicia fava*. Criza hemolitică apare brusc, fie la cîteva ore după ingerarea plantei, fie imediat după inhalarea polenului său. Copiii sînt cel mai des afectați. După criza de hemoglobinurie apar icter și febră. Această sensibilitate are o predispoziție familială. În această categorie de anemii hemolitice intră și anemia primăvăratică de Bagdad, datorită plantei *Verbena hybrida*.

Astfel de indivizi prezintă un deficit de enzime eritrocitare ca glucoză-6-fosfat-dehidrogenază, anomalie responsabilă de această susceptibilitate a organismului.

h) *Agenți infecțioși* : *B. perfringens*, streptococi, stafilococi, pneumococi, bacil tuberculos, bacil coli, bacil tific, vibrionul holeric, virusuri.

i) *Paraziți* : paludism, bartoneloză (febră de Oroya), Kala-Azar.

Anemii hemolitice prin deficiență în glucoza-6-fosfat-dehidrogenaza (G-6-P-D)

Descoperirea deficienței în G-6-P-D a eritrocitelor a deschis un nou capitol în hematologie, acela al anemiilor hemolitice enzimopenice. Acest tip de anemie hemolitică se situează între anemiile hemolitice congenitale și cele cîștigate. Astfel acestea se datoresc unei tulburări congenitale intrinsece a eritrocitului, dar care nu se exteriorizează decît prin intervenția unui factor extraeritrocitar exogen, fie medicamentos (antimalarice de sinteză, sulfamide, fenacetină, vitamină K_2, PAS, aspirină etc.), fie substanțe vegetale ca *Vicia fava* (favism).

Deficiența în G-6-P-D constituie un caracter ereditar, ce corespunde la o mutație, legat de cromozomul sexual X. Se găsește răspîndit în unele țări din bazinul mediteranean, în Asia Mică, în Extremul Orient, în Africa, la negrii din America. Numărul indivizilor, pe tot globul, care au această deficiență este evaluat azi ca fiind de peste o sută de milioane.

Pe lîngă deficiența în G-6-P-D, eritrocitele acestor indivizi prezintă o scădere cu circa 40% a activității catalazei; de asemenea, se constată o scădere marcată a glutationului redus. În schimb, activitatea glutation-reductazei și a aldolazei sînt crescute.

Eritrocitul transformă glucoza circulantă în glucoză-6-fosfat pe care o utilizează în două moduri și pentru două scopuri diferite :

— în anaerobioză, prin calea Embden-Meyerhof care îi procură 9/10 din energia de care are nevoie;

— în aerobioză, prin calea pentozelor a lui Dickens-Horecker, care îi furnizează restul de energie și care, mai ales, îi procură TPNH (trifosfopiridin-nucleotid redus), substanță foarte importantă pentru menținerea integrității eritrocitului.

Singura sursă de TPNH în eritrocit provine prin calea pentozelor din primele două reacții, după cum urmează :

$$\text{I. G-6-P} + \text{TPN} \xrightleftharpoons{\text{G-6-P-D}} \text{6-P-G} + \text{TPHN} + H^+$$

$$\text{II. 6-P-G} + \text{TPN} \xrightleftharpoons{\text{6-Fosfogluconat dehidrogenază}} \text{R-5-P} + CO_2 + \text{TPNH} + H^+$$

G-6-P = glucoză-6-fosfat
6-P-G = 6 fosfogluconat
R-5-P = ribuloză-5-fosfat
TPN = trifosfopiridin-nucleotid
TPNH = trifosfopiridin-nucleotid redus

TPNH intervine tocmai în metabolismul glutationului după cum urmează :

$$\text{III. 2 GSSG} + \text{TPNH} + H^+ \xrightleftharpoons[\text{reductază}]{\text{Glutation}} \text{2 GSH} + \text{TPN}^+$$

GSSG = glutation oxidat
GSH = glutation redus

Cheia care stăpînește acest sistem enzimatic este G-6-P-D. Se înțelege că indivizii cu deficiență în G-6-P-D nu sînt capabili de a produce suficient TPNH; scade glutationul redus.

Astfel eritrocitele acestor bolnavi, avînd o deficiență în TPNH și în catalază, nu sînt capabili să reziste acțiunii nocive a unor medicamente care oxidează hemoglobina în mod ireversibil în methemoglobină, sulfhemoglobină, verdoglobină, coleglobină etc., ceea ce duce la moartea și liza celulei.

Atît TPNH, cît și catalaza joacă un rol important în protejarea hemoglobinei față de agenții nocivi oxidanți. TPNH mai intervine și în metabolismul lipidic pentru formarea acizilor grași din membrana celulară care joacă un rol sigur în rezistența la hemoliză.

Studiul clinic. *La nou-născut și sugar.* Deficiența în G-6-P-D se poate manifesta la nou-născut cu un icter grav. Se crede că aceste ictere se datoresc deficienței celulei hepatice în G-6-P-D. Procesul de glicuroconjugare și așa deficient la toți nou-născuții este și mai exagerat în astfel de cazuri, încît consecințele hemolizei fiziologice sînt greu compensate și acumularea bilirubinei neconjugate poate provoca un icter nuclear. Aceste complicații sînt și mai de temut, cînd se adaugă și o hemoliză de origine medicamentoasă provocată de deficiența în G-6-P-D. Agresiunea medicamentoasă poate interveni înainte de naștere pe cale transplacentară. După naștere, căile sînt diverse : prin administrare de medicamente, prin laptele matern sau laptele de capră care a ingerat substanțe nocive (*Vicia fava*).

La adult. Deficiența în G-6-P-D se traduce printr-o anemie discretă sau lipsă de anemie. Boala se manifestă clinic cu ocazia prizei de medicamente nocive sau ingestiei de alimente care declanșează criza hemolitică (*Vicia fava*). În astfel de împrejurări hemoliza survine după 2—3 zile de latență, atinge un maximum a 8-a zi. Și după aproximativ o lună se instalează o fază de echilibru.

O caracteristică hematologică este apariția de corpusculi Heinz pe eritrocite o dată cu începutul hemolizei.

Favismul este un sindrom hemolitic care apare după ingerarea plantei leguminoase *Vicia fava*. Inhalarea de făină sau polen din plantă poate dezlănțui sindromul. Cercetările au arătat că cei ce suferă de favism au o deficiență congenitală enzimatică de G-6-P-D. În favism, pe lîngă deficiența în G-6-P-D s-a mai constatat absența unui factor seric de protecție și prezența de anticorpi.

Punerea în evidență a deficienței în G-6-P-D

1. Cercetarea calitativă a G-6-P-D (Motulsky și Campbell). Sîngele se poate recolta pe oxalat sau citrat, sau heparină. Pentru a exclude erorile datorită diferențelor în concentrația hemoglobinei se folosește sedimentul de eritrocite în loc de sînge integral.

Se lucrează în tuburi speciale Tunberg sub vid înaintat sau în tuburi cu dop de cauciuc, vidul făcîndu-se prin înțeparea dopului.

Se face următorul amestec : 1 ml apă distilată, 0,01 ml sediment eritrocitar și 0,2 ml tampon tris 0,74 M,pH 8,5.

La acest prim amestec se adaugă succesiv următorii reactivi :

0,05 ml soluție 0,165 g glucoză-6-fosfat sare disodică, în 10 ml H_2O ;

0,05 ml soluție trifosfopiridin-nucleotid 0,1 % ;

0,25 ml soluție albastru briliant-crezil 0,32 g la 1 000 ml apă.

După amestec, reactivii se acoperă cu ulei de parafină. În tubul de amestec se face vid puternic cu ajutorul unei pompe electrice. Tubul se incubează în baie de apă la 37° și se cercetează decolorarea la 50, 75, 100, 120, 180 de minute și la 6 ore.

Probele care se decolorează complet pînă la 100 de minute sînt considerate cu activitate normală în G-6-P-D.

Probele care nu se decolorează la 3 sau 6 ore sînt considerate practic ca fără activitate enzimatică.

O decolorare parțială la 100 de minute este un semn de deficiență enzimatică parțială.

2. Testul de reducere a methemoglobinei (Brewer). *Principiu* : oxidarea hemoglobinei în methemoglobină cu ajutorul nitritului de sodiu este reversibil transformată în hemoglobină în prezența albastrului de metilen. Această reversibilitate nu se petrece în deficiența în G-6-P-D, cînd toată hemoglobina se transformă în methemoglobină.

Reactivi :

1. Nitrit de Na 0,18M în 0,28M glucoză

Nitrit de Na	1,25 g
Glucoză	5 g
Apă ad	100 ml

2. Albastru de metilen : 0,0004M în ser fiziologic

Albastru de metilen . . .	0,150 g
Soluție ClNa $9^0/_{00}$	1 000 ml

3. Anticoagulanți :

Heparină : 0,1 ml (500 U) pentru 10 ml sînge.

Tehnica. În trei tuburi numerotate I, II și III se pun următorii reactivi : în tubul II, 0,1 ml soluție de nitrit de sodiu. În tubul III se adaugă 0,1 ml nitrit de sodiu și 0,1 ml soluție de albastru de metilen.

În toate cele trei tuburi se adaugă cîte 2 ml sînge heparinat și se omogenizează ușor. În caz de anemie se va corecta hematocritul probei de sînge la 40% ± 5% prin scoatere de plasmă.

Nr. tubului	I	II	III
Nitrit de Na	—	0,1 ml	0,1 ml
Albastru de metilen	—	—	0,1 ml
Sînge	2 ml	2 ml	2 ml

Tuburile neastupate se pun la 37°, timp de 3 ore, după care se omogenizează ușor. Se ia din fiecare tub 0,1 ml ce se adaugă în cîte o eprubetă care conține 10 ml apă distilată omogenizîndu-se cu pipeta.

Interpretarea rezultatelor. Tubul I este un tub normal de referință, care în soluția apoasă (0,1 ml la 10 ml apă) dă o culoare roșie clară.

Tubul II este tubul pozitiv, care în soluție apoasă dă o culoare brună (methemoglobină).

Tubul III reprezintă proba propriu-zisă, culoarea căruia se compară vizual cu culoarea probei normale (tub I) și cu culoarea probei sigur pozitive (tub II).

Interpretare. a) La indivizii normali, culoarea probei din tubul III este roșie-clară, identică ca la tubul I.

b) La bolnavii cu deficiență în G-6-P-D formă homozigotă, culoarea probei din tubul III este brună, identică ca la tubul II.

c) La indivizii heterozigoți, culoarea este intermediară și variază de la roșie spre brună.

Testul de reducere a methemoglobinei, descris de Brewer inițial după o tehnică spectrofotometrică, a fost modificat și adaptat tot de Brewer pentru citirea directă vizuală la lumina zilei. Acest test este foarte sensibil și a fost verificat de noi într-un caz de deficiență în G-6-P-D cu rezultate foarte bune. Testul este simplu și nu necesită reactivi greu de procurat și costisitori.

La citirea rezultatelor acestui test, noi am adus următoarea modificare: după 3 ore de incubație, sîngele se omogenizează, apoi cu ajutorul unei pipete Pasteur se ia din fiecare tub o picătură, care se pune pe o bucată de hîrtie de filtru în ordinea numerotării tuburilor. Hîrtia de filtru fiind albă, prin contrast se vede foarte clar diferența între culoarea roșie și brună. Citirea trebuie să se facă în primele 5 minute.

3. Testul de formare a corpusculilor Heinz (Beutler E.)

Reactivi: 1. Soluție tampon pH = 7,6

KH_2PO_4 M/15	1,3 vol.
Na_2HPO_4 M/15	8,7 vol.

Se adaugă 0,200 g glucoză la 100 ml.

2. Soluție de acetilfenilhidrazină 0,1 g% în soluție de tampon. Se folosește în prima oră de la preparare.

3. Soluție de cristal violet:

Cristal violet	2 g
Soluție NaCl 0,73 % g	100 ml

Se agită, apoi se filtrează. Filtratul se amestecă în părți egale cu soluția NaCl 0,73% g.

4. Heparină ca anticoagulant.

Tehnica. La 2 ml soluție de acetilfenilhidrazină se adaugă 0,1 ml sînge integral spălîndu-se pipeta în soluție. Amestecul se pune în baie de apă la 37°. După 2 ore se agită ușor pentru aerisire, iar după alte 2 ore (total 4 ore de incubație) se ia o picătură mică din amestec și se amestecă între lamă și lamelă cu o picătură mai mare de soluție cristal violet; după 5—10 minute se examinează la microscop cu imersie. Sau se pot întinde frotiuri din amestecul între lamă și lamelă care se examinează după uscare, cu imersie. Trebuie procedat în așa fel ca eritrocitele să fie rare și nu suprapuse.

Rezultate: se numără 100 de eritrocite și se notează numărul de corpusculi Heinz ce se găsesc pe fiecare. Astfel se determină procentajul eritrocitelor care conțin peste 5 corpusculi Heinz.

Interpretare. Eritrocitele de la bolnav: procentajul eritrocitelor care conțin 5 sau mai mulți corpusculi Heinz variază de la 45—92% cu o medie de 67,8%; eritrocitele normale: procentajul eritrocitelor care conțin 5 sau mai mulți corpusculi Heinz variază de la 0—28% cu o medie de 11,9%.

3. ANEMIILE MACROCITARE NORMOCROME

Se deosebesc:

— anemia megaloblastică tip Addison-Biermer;

— anemii megaloblastice nebiermeriene.

Anemia megaloblastică Addison-Biermer

Este determinată de lipsa factorului intrinsec, deficiență care împiedică absorbția vitaminei B_{12}.

Clinic, este caracteristic sindromul digestiv, cu insuficiență secretoare cantitativă și calitativă a sucului gastric. Sucul gastric nu conține nici acid clorhidric liber, nici pepsină, nici labferment și nici acid latic. Această aclorhidrie este precoce și aproape constantă și refractară chiar la administrare de histamină. Factorul intrinsec Castle este absent (proba Singer este negativă: injectarea de suc gastric la șobolan nu produce reticulocitoză).

Sîngele periferic. Se găsește anemie marcată, deseori în jurul a 1 000 000 /mm³.

Hemoglobina este relativ mai puțin scăzută decît numărul de eritrocite, ceea ce dă o valoare globulară crescută, în mod obișnuit 1,3 pînă la 1,6.

Se găsește anizocitoză remarcabilă. Elementele acestei anizocitoze sînt megalocitele, în număr relativ mic, globule imense, ovalare sau rotunde, cu diametrul mare depășind 12 μ, uniform colorate în roşu închis. În rest se găsesc numeroase macrocite şi chiar rare microcite.

Diametrul mediu eritrocitar este crescut, peste 8,5 μ. Curba Price-Jones este mult deviată la dreapta, cu baza mult lărgită.

Volumul eritrocitar mediu este crescut peste **105** μ^3.

Conţinutul eritrocitar mediu în hemoglobină este crescut.

Concentraţia eritrocitară medie în hemoglobină este normală, adică aproximativ 34% (normocromă).

Rar se pot întîlni eritroblaşti sau megaloblaşti în periferie; unele eritrocite au corpusculi Jolly.

Reticulocitoza este normală (reticulocitele cresc în caz de remisiune spontană sau terapeutică).

Rezistenţa osmotică este uşor crescută, datorită numărului mare de megalocite, şi revine la normal în timpul remisiunilor prin apariţia eritrocitelor normale.

VSH este crescută.

In seria leucocitară leucopenia este constantă, cu cifre între 2 000 şi 4 000 leucocite/mm^3, şi se datoreşte scăderii polimorfonuclearelor neutrofile. Există de asemenea eozinopenie sau aneozinofilie şi limfocitoză relativă.

Formula Arneth este deviată spre dreapta. Se găseşte o hipersegmentare, care poate să meargă pînă la 7 sau 10 lobi nucleari (pleiocariocite), deseori gigantism celular. Uneori apar metamielocite şi chiar mielocite la periferie.

Numărul de trombocite este frecvent scăzut; apar megatrombocite.

Măduva hematogenă. In seria eritrocitară leziunea esenţială este megaloblastoza medulară, care înlocuieşte în mare parte eritroblastoza normală. Cea mai mare parte din megaloblaşti sînt bazofili (măduvă albastră). Cele 3 caracteristici ale megaloblaştilor sînt: *a*) talia foarte mare, pînă la 30 μ diametru; *b*) citoplasmă abundentă, albastră, cu un halou subţire alb perinuclear; *c*) extrema fineţe a tramei nucleare, presărată cu mici puncte colorate pe un fond alb. Pe lîngă megaloblaştii bazofili se găsesc rari promegaloblaşti şi numeroşi megaloblaşti policromatofili şi ortocromatofili şi numeroşi normoblaşti. Hiperplazia elementelor nucleate ale seriei roşii depăşeşte deseori 100 sau 150 pentru 100 elemente ale seriei albe. Megaloblastoza este totdeauna importantă şi reprezintă jumătate din elementele seriei roşii. Uneori se poate observa trecerea de la celula reticulară pînă la megaloblast, prin diferitele stadii de diferenţiere.

Trebuie subliniată o greutate de diagnostic citologic: un tratament antipernicios discret, incapabil de a vindeca anemia, poate masca megaloblastoza tipică.

In seria leucocitară se găseşte un număr crescut de promielocite; o altă caracteristică importantă a contextului citologic este prezenţa de metamielocite gigante.

In seria trombocitară se găsesc deseori megacariocite cu nuclei hipersegmentaţi.

Se observă eritrofagocitoză marcată în măduvă (macrofage).

Examenele biochimice. Sideremia este crescută: 200—300 γ la 100 ml ser. Lipsa vitaminei B_{12} sau a acidului folic determină o scădere a sintezei protoporfirinei; în lipsa protoporfirinei fierul nu este încorporat în molecule de hem, nu este utilizat şi se depune. Aşa se explică creşterea hemosiderinei medulare, care se pune în evidenţă prin reacţii citochimice: numărul sideroblaştilor este crescut. Siderofilina este scăzută.

În rezumat, sideremia este crescută, siderofilina scăzută, protoporfirina liberă eritrocitară scăzută, sideroblaştii sînt crescuţi.

Important de subliniat este faptul că sideremia din anemia pernicioasă poate să scadă la normal sau sub normal în următoarele împrejurări: 1) cînd se asociază hemoragii cronice repetate; 2) stări infecţioase latente; 3) cînd se asociază neoplasmul gastric.

Criteriile de eficacitate a tratamentului (vitamina B_{12}) sînt:

Sîngele periferic. 1) Criza reticulocitară apare din a treia pînă la a şasea zi şi durează 8 pînă la 10 zile, numărul de reticulocite atingînd 15—20%. *2*) Viteza de regenerare a eritrocitelor este un indiciu foarte bun al eficacităţii terapeuticii; un tratament eficace trebuie să realizeze o creştere săptămînală a eritrocitelor cu 1 000 000/mm^3 la un biermerian foarte deglobulizat. *3*) Numărul de eritrocite creşte mult mai repede decît cantitatea de hemoglobină; rezultă o scădere a valorii globulare pînă la normal şi sub normal; fierul este folosit şi sideremia scade la normal sau sub normal, sideroblaştii dispar (necesitate de a se asocia fierul în terapeutică în unele cazuri). *4*) Extractele hepatice produc frecvent o eozinofilie, ceea ce se întîmplă rar cînd se foloseşte vitamina B_{12}. Procentul polimorfonuclearelor hipersegmentate rămîne ridicat timp îndelungat.

Măduva. Sub influența tratamentului megaloblastoza medulară diminuează foarte repede, chiar după primele 24 de ore și dispare rapid chiar la doze mici, insuficiente din punct de vedere terapeutic. Astfel, modificările survenite la nivelul măduvei nu permit o apreciere valabilă asupra eficacității tratamentului. Diagnosticul este mult îngreunat la bolnavii care au primit cîteva doze de vitamină B_{12}. În astfel de cazuri se recurge la textul Schilling.

Testul Schilling: acest test constă în folosirea vitaminei B_{12} radioactivă în diagnosticul anemiei Biermer. Administrată pe cale orală ea permite punerea în evidență a defectului de absorbție digestivă a vitaminei B_{12} chiar dacă bolnavul, tratat sau în remisiune, nu prezintă nici un semn hematologic sau clinic caracteristic.

Se folosește vitamina B_{12} marcată cu Co^{58}. Se administrează o doză orală corespunzînd la 1 sau 2 μc. După două ore de la administrare, i se face bolnavului o injecție intramusculară de 1000 γ vitamină B_{12} ordinară (neradioactivă); această injecție se repetă după 24 de ore și 48 de ore de la ingerarea dozei de vitamină B_{12} marcată.

Se măsoară radioactivitatea eliminată în urină în primele două zile, separat pentru urina strînsă în primele 24 de ore și separat pentru proba între 24 și 48 de ore.

Radioactivitatea urinei se măsoară comparativ cu un volum identic dintr-o diluție martor de vitamină B_{12} marcată, preparată din diluția soluției administrată bolnavului.

Rezultate: la indivizii normali se elimină 8% pînă la 25% din radioactivitatea ingerată în urinile din primele 48 de ore. Bolnavi de anemie Biermer 0 pînă la 3%.

Anemiile megaloblastice nebiermeriene

(Anemii parabiermeriene)

Simptomele comune hematologice ale acestor anemii sînt asemănătoare cu ale anemiei Biermer: hipercromie (valoare globulară crescută), macrocitoză, megaloblastoză medulară. Acidul clorhidric este prezent în sucul gastric, exceptînd cîteva cazuri (sprue, pelagră gravă, boala celiacă).

Anemia megaloblastică botriocefalică. În această anemie parabiermeriană sucul gastric conține acid clorhidric liber și factor intrinsec. Se întîlnește la orice vîrstă. Este datorită faptului că acțiunea proteolitică a sucurilor digestive este redusă în prezența parazitului, ceea ce reduce eliberarea vitaminei B_{12} din alimente. De asemenea, parazitul consumă vitamina B_{12}. Se vindecă prin eliminarea parazitului.

Anemia megaloblastică gravidică este relativ rară. Se explică prin consumul exagerat de principiu antianemic, care trece la făt. Dispare după avort sau după naștere.

Anemia megaloblastică pelagroasă se întîlnește în cazurile grave de boală. Răspunde favorabil la tratamentul cu acid folic, complex vitaminic B și extract de ficat.

Anemia megaloblastică din *sprue tropical* este influențată favorabil de administrarea de acid folic, complex vitaminic B, extract de ficat.

Anemia megaloblastică din *sprue nostras* se comportă identic cu cea tropicală.

Anemia megaloblastică infantilă se întîlnește la sugar în carențele alimentare (lapte de capră și alte carențe). Este foarte puțin influențată de administrarea de vitamină B_{12} și mult mai bine de acidul folic. Se corectează cu un regim alimentar normal.

Anemia megaloblastică tropicală (Lucy Wills) se datorește carențelor alimentare mai ales în proteine. Răspunde bine la complexul vitaminic B, extract de ficat și acid folic.

Anemia megaloblastică nutrițională, datorită unor carențe alimentare, răspunde la acid folic și complex vitaminic B și la regim bogat în proteine.

Anemia megaloblastică după gastrectomie este influențată favorabil de vitamina B_{12}.

Anemia megaloblastică în cirozele hepatice beneficiază mai mult de tratamentele cu extract de ficat.

Mai există anemie megaloblastică în *stenozele intestinale*, în *tuberculoza cronică* asociată cu insuficiență hepatică.

Anemia megaloblastică acrestică. Apare megaloblastoză medulară, sucul gastric este normal. Afecțiunea este rezistentă la vitamină B_{12}, acid folic sau extract hepatic. Se va încerca complex vitaminic B.

Megaloblastoza din leucemiile acute. În cursul unei leucemii acute se poate întîlni o megaloblastoză medulară datorită unui mecanism dublu:

— consum exagerat de acid folic, datorită hiperplaziei, metaplaziei, și anaplaziei celulare din seria albă, creînd o stare carențială pentru seria roșie;

— administrare de substanțe cu acțiune antifolică ca tratament al leucemiei (aminopterină).

POLIGLOBULIILE

Poliglobulia reprezintă creșterea numărului de eritrocite peste 5 500 000/mm³ la bărbat și 5 000 000 /mm³ la femeie.

Poliglobulii relative, prin hemoconcentrație. Astfel de poliglobulii se numesc false. Survin prin deperdiție plasmatică, deshidratare. Masa sanguină și volumul plasmatic sînt diminuate, masa eritrocitară însă este normală ; de aici și denumirea de poliglobulii relative.

Survin în următoarele cazuri : diaree profuze, transpirații profuze, vărsături incoercibile de sarcină, șoc traumatic, șoc prin arsuri și alte stări de șoc, puncții de ascită repetate, insuficiență suprarenală acută etc.

Poliglobuliile adevărate se numesc și *poliglobolii absolute* și se caracterizează prin masa sanguină crescută, masa globulară crescută și volum plasmatic normal.

TABELUL 77

Poliglobulie adevărată și relativă, comparație

	Poliglobulie adevărată	Poliglobulie relativă
Masa sanguină	crescută	diminuată
Masa globulară	crescută	normală
Volum plasmatic	normal	diminuat

Poliglobuliile adevărate sînt de două feluri :

— poliglobulii secundare de cauză cunoscută ;

— poliglobulii primitive : boala Vaquez.

1. POLIGLOBULII SECUNDARE DE CAUZĂ CUNOSCUTĂ

a) *Poliglobulia cardiopatiilor congenitale cianogene.* Poliglobulia este provocată printr-o diminuare a conținutului în oxigen al sîngelui arterial : saturația în O_2 a sîngelui arterial este sub 75%. Pentru ca să apară cianoza trebuie să existe cel puțin 5 g de hemoglobină redusă la nivelul capilarelor (5 g hemoglobină la 100 ml sînge).

b) *Poliglobulia pneumopatiilor cronice* se observă în emfizemul pulmonar, pneumoconioze, fibroze progresive, arterita pulmonară, secundară unei stenoze mitrale sau sifilisului în boala Ayerza. Se asociază și o insuficiență ventriculară dreaptă.

c) *Poliglobulia de altitudine* : diminuarea tensiunii de oxigen duce la o anoxemie cronică.

d) *Poliglobulia cu hipertensiune arterială* — boala Gaisbock — arterioscleroză, atingere renală.

e) *Poliglobulii toxice.* Unele intoxicații cronice cu doze mici de substanțe cu efect deglobulizant — ca arsenic, fosfor, benzol, anilină, CO, derivați de gudron etc. — produc o excitare medulară, o hiperplazie eritroblastică compensatoare. Aceste intoxicații se însoțesc de prezența de sulfhemoglobină, methemoglobină.

f) Poliglobulia din *afecțiunile splenice* : tuberculoza primitivă a splinei, chistul hidatic al splinei, splenomegaliile paludice. Uneori poate să apară o poliglobulie după splenectomie.

g) Poliglobulii prin *leziuni ale sistemului nervos central* se observă în : tumori cerebrale, leziuni infecțioase, ca encefalite, meningite, leziuni traumatice, boala Parkinson. Poliglobulia apare în leziunile infundibulo-tuberiene.

h) *Poliglobulii endocrine* se întîlnesc în boala Cushing, corticosuprarenalomul malign, boala Basedow.

i) Poliglobulii se mai observă în *ulcerul gastric sau duodenal cu hipersecreție,* se pare datorită producerii în exces a factorului Castle. După Cushing, în diencefal ar exista un centru trofic al stomacului, a cărui lezare ar provoca hiperaciditatea și ulcerul.

j) Poliglobulia poate să apară și consecutiv unui *tratament intensiv cu vitamină B_{12}* în anemia biermeriană.

TABELUL 78

Poliglobuliile adevărate, comparativ

	Poliglobulie secundară	Poliglobulie primitivă
Splina	normală	splenomegalie
Numărul de leucocite	normal	crescut
Numărul de trombocite	normal	crescut

2. POLIGLOBULIA PRIMITIVĂ

Poliglobulia primitivă sau *boala Vaquez* constituie o entitate clinică bine caracterizată, dar de etiologie necunoscută. Survine la ambele sexe.

Din simptomatologia clinică fac parte : eritroza, splenomegalia, care este un semn capital dar poate lipsi, uneori dilatarea precoce a venelor fundului de ochi, arterele rămînînd nemodificate.

Sîngele periferic arată :

— Poliglobulie : 7—8 milioane eritrocite/mm³.

— Eritrocite de dimensiuni normale.

— Ușoară hipocromie : valoare globulară 0,7—0,8 .

— Reticulocite : normale.

— Uneori se găsesc normoblaști pe frotiu.

— Rezistență globulară : normală.

— Durata de viață a eritrocitelor : normală.

— Numărul leucocitelor este crescut : 10 000–15 000 și uneori 30 000/mm^3 cu polinucleoză neutrofilă 75–90%, eozinofilie pînă la 10% și uneori bazofilie 1–13%.

— Frecvent se întîlnesc metamielocite, mielocite și chiar promielocite și mieloblaști (imagine de reacție leucemoidă). Spre deosebire de poliglobuliile secundare, în boala Vaquez se găsește o activitate crescută a fosfatazei alcaline leucocitare.

— Trombocitele: în 2/3 din cazuri cresc peste cifra de 300 000/mm^3 și uneori se găsesc cifre între 500 000 și 1 000 000/mm^3, trombocitoza putînd fi însă și normală.

Mielograma arată bogăție accentuată în elemente celulare, predomină seria roșie. Aproape întreg țesutul adipos medular este înlocuit cu țesut hematopoietic. Megacariocite în număr crescut.

Caracteristică pentru poliglobulia primitivă este hiperplazia seriei eritroblastice cu număr crescut de megacariocite, care o deosebesc de poliglobuliile secundare.

După Di Guglielmo, este vorba de o mieloză hiperplazică simplă, fără apariția de elemente anormale.

Tabloul biohematologic se caracterizează prin :

— Masa sanguină crescută, masa globulară crescută, volumul plasmatic normal sau diminuat.

— Fierul seric : scăzut. Fierul seric crește la bolnavii tratați cu fosfor radioactiv sau cu tratament hemolizant.

— Vîscozitatea sîngelui : totdeauna crescută.

— ***Tulburări de hemostază*** :

— retracție defectuoasă a cheagului ;

— funcția tromboplastică plachetară deficitară ;

— fibrinoliză cronică, latentă ; această liză produce și o scădere a proaccelerinei.

Poliglobulia și sindromul de hiperplazie eritromieloidă a splinei

Aspectele mielogramei și splenogramei în poliglobulia primitivă sînt variate. Astfel se pot întîlni :

— Măduvă bogată cu splină congestivă simplă.

— Măduvă bogată cu splină eritromielocitară.

— Măduvă săracă fibroasă cu splină eritromielocitară.

Aceste posibilități reprezintă sindroame diferite sau momente diferite în evoluția aceleiași boli. Se știe că poliglobulia de tip Vaquez poate evolua spre o leucemie mieloidă cronică.

ERITREMIILE

Termenul de eritremie reprezintă pentru seria eritrocitară ceea ce termenul de leucoză reprezintă pentru seria albă.

Ca și în leucoză, se descriu în eritremii două forme : forma acută (boala Di Guglielmo sau eritromieloza acută) și forma cronică (tip Heilmeyer-Schöner).

O formă intermediară între eritremii și leucoze este reprezentată de eritroleucoză, care cuprinde forme cronice și acute.

ERITREMIA ACUTĂ (BOALA DI GUGLIELMO)

Clinic, afecțiunea se caracterizează prin : semne de anemie severă, febră ridicată, splenomegalie constantă și pronunțată, hepatomegalie frecventă, ganglioni normali, sindrom hemoragic : mai pronunțat în stadiul final.

Sîngele periferic arată :

— Anemie intensă, atingînd rapid 1 000 000 eritrocite/mm^3, normocromă.

— Eritroblastemie variabilă, mergînd de la 30 000 la 250 000 eritroblaști/mm^3.

Eritroblaștii sînt de toate tipurile, însă predomină formele tinere, bazofile. Oprirea în maturație a seriei roșii poate să meargă pînă la dispariția formelor adulte de eritroblaști, vorbindu-se în acest caz de *hiatus eritremic*.

Printre eritroblaști se găsesc forme atipice cu 2–3 nuclei (poliploidie eritroblastică), nuclei bilobați sau trilobați, unii cu nucleoli monstruoși. Di Guglielmo a denumit aceste elemente paraeritroblaști. Se întîlnesc nuclei cu cromatină laxă, pseudomegaloblastică. Eritroblaștii mai maturi pot avea nuclei picnotici, în trifoi sau în ciorchine, care denotă tulburări grave de carioliză, însoțite de cariorexis.

— Important de semnalat este faptul că numărul de reticulocite este scăzut.

— În mod obișnuit se găsește leucopenie cu neutropenie.

— Trombocitele sînt scăzute.

— În sîngele periferic se mai găsesc celule reticulare.

— Rezistența globulară nu este modificată.

Medulograma se caracterizează prin :

— Măduvă bogată cu seria roşie mult hiperplaziată ; raportul granulocite/eritroblaşti este mult micşorat.

— Seria roşie prezintă o inhibiţie de maturaţie în stadiul de eritroblaşti bazofili. Elementele prezintă atipii, monstruozităţi, ca cele descrise în sîngele periferic, caracter foarte important pentru diagnosticul diferenţial, mitoze atipice. Există o disociere între maturaţia nucleului şi citoplasmei (asincronism nucleo-citoplasmatic), nucleul rămînînd foarte tînăr, în timp ce citoplasma evoluează.

Există o puternică hiperplazie reticulară şi se pot observa forme de trecere de la celula reticulară la elementele eritrocitare, originea paraeritroblaştilor fiind aceste celule reticulare.

Splina şi ficatul prezintă o metaplazie eritroblastică cu aceleaşi caracteristici.

Evoluţia este rapid fatală, de 1—2 luni. Uneori se prelungeşte 5—6 luni. Formele prelungite, care iniţial au evoluat cu caractere de eritremie, devin cu timpul eritro-leucemice, prin proliferarea seriei albe.

ERITREMIA CRONICĂ (TIP HEILMEYER-SCHÖNER)

Afecţiunea începe cu un tablou de anemie hemolitică mai mult sau mai puţin accentuată, cu reticulocitoză crescută şi cu icter fără bilirubinurie. Splenomegalia este pronunţată.

Sîngele perferic se caracterizează prin :

— Valoarea globulară se menţine în jur de 1, diametrul mediu eritrocitar este normal, deşi există o anizocitoză şi poikilocitoză pronunţată. Se întîlnesc deseori corpusculi Jolly şi inele Cabot.

— Numărul de leucocite este normal, dar formula leucocitară este deseori puternic deviată la stînga.

— Eritroblaştii sînt foarte numeroşi în sîngele periferic, cu forme atipice.

Frotiurile din produsul de puncţie splenică arată metaplazie eritroblastică.

Medulograma arată că în măduvă predomină eritropoeza. Se găsesc eritroblaşti cu 2—3—4 nuclei, uneori cu nucleu pseudomegaloblastic.

Diagnosticul diferenţial se face cu toate afecţiunile care prezintă eritroblastemie :

— anemii hemolitice (a se vedea clasificarea) ;

— metaplazie splenică în boala Albers-Schönberg şi splenomegalia mieloidă cronică a adultului (osteomieloscleroză) ;

— metastaze osoase canceroase ;

— leucoză acută ;

— hiposplenism ;

— anemie acută posthemoragică ;

— eritroblastoză fiziologică a prematurilor sau nou-născuţilor ; nou-născutul poate prezenta în mod normal 1—2 % eritroblaşti în sîngele periferic ; copilul născut prematur poate prezenta la naştere un număr mai mare de eritroblaşti în sîngele periferic.

TABELUL 79

Diagnosticul diferenţial între o stare hemolitică acută cu puternică reacţie eritroblastică şi eritremia acută

	Reacţie eritroblastică	Eritremie acută
Etiologie	deseori cunoscută : conflict imunologic, intoxicaţie etc.	necunoscut
Sînge periferic	reticulocite crescute eritroblaşti normali	reticulocite scăzute eritroblaşti atipici
Leucocite şi trombocite	crescute	scăzute
Măduvă	predomină eritroblaştii ortocromatofili (maturaţie normală) eritroblaşti normali	predomină eritroblaştii bazofili eritroblaşti atipici
Bilirubinemie indirectă	foarte crescută	uşor crescută

PORFIRINURII ŞI PORFIRII

Folosirea izotopilor radioactivi a permis studiul detaliat al sintezei hemoglobinei :

Protoporfirina + Fier → Hem + Globină → Hemoglobină.

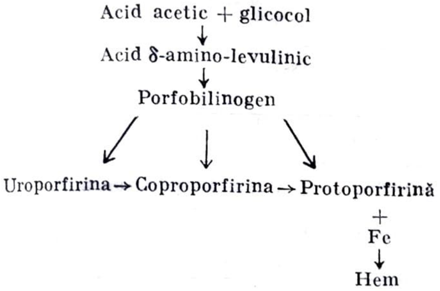
Sinteza nucleului porfirinic. Cercetările făcute cu ajutorul aminoacizilor marcaţi au pus în evidenţă rolul acidului acetic şi al glicocolului ca materiale de sinteză a nucleului porfirinic al hemoglobinei :

a) glicocolul cu acidul succinic dă acidul α-amino-β-cetoadipic, care prin decarboxilare dă acidul δ-amino-levulinic ;

b) 2 molecule de acid amino-levulinic dau un derivat monopirolic, care este porfobilinogenul ;

c) condensarea a 4 molecule de porfobilinogen cu eliminare de NH_2 dă o porfirină.

În acest lanţ de sinteze, uroporfirina III se formează prima, apoi coproporfirina şi în cele din urmă protoporfirina.



Aceşti compuşi, care marchează etapele sintezei hemoglobinei, sînt prezenţi în mod normal sub formă de urme în eritrocite şi în excreţii (urină, fecale). În anumite condiţii patologice cantitatea lor poate fi modificată şi prezintă interes diagnostic.

Eritrocitele şi mai ales reticulocitele conţin, în mod normal, o cantitate mică de protoporfirină liberă : 20—50 γ la 100 ml sînge.

Protoporfirina liberă eritrocitară variază în stări patologice după cum urmează :

Carenţe în fier	200— 800 γ la 100 ml sînge
Saturnism	200—2000 γ la 100 ml sînge
Anemie pernicioasă	15— 30 γ la 100 ml sînge
Infecţii	50— 300 γ la 100 ml sînge

Urina normală conţine porfirine : excreţia în 24 de ore este de 100 γ : predomină coproporfirina I; coproporfirina III este excretată în cantităţi mici, iar uroporfirina numai ca urme.

PORFIRINURIILE SIMPTOMATICE

Se caracterizează prin creşterea excreţiei urinare de porfirine : 600—900 γ/24 de ore.

Coproporfirina III predomină în boala Hodgkin, în anemia aplastică, în poliomielită.

Coproporfirina I predomină în anemiile hemolitice biermeriene şi leucemice, şi în cursul unor tulburări hepatice.

În intoxicaţia cu plumb sau cu alte metale grele se produce o blocare a transformării coproporfirinei III în protoporfirină. Rezultă o excreţie urinară crescută de coproporfirine. De asemenea, fixarea atomului de Fe pe protoporfirină este împiedicată, fapt care explică creşterea protoporfirinei libere eritrocitare şi a fierului care se depune în sideroblaşti şi siderocite.

Coproporfirina urinară normală şi în diferite stări patologice (în 24 ore) este :

Normal la bărbat	100— 300 γ
Normal la femeie	75— 275 γ
Saturnism	500—3000 γ
Poliomielită	400— 900 γ
Afecţiuni hepatice	300— 800 γ
Boala Hodgkin	200—1000 γ
Anemia hemolitică	200— 400 γ
Azotemie	10— 75 γ
Anemie pernicioasă	150— 400 γ

PORFIRIILE

Se disting două forme de porfirii :

— porfiria congenitală ;

— porfiria hepatică.

Porfiria congenitală (porfiria eritropoetică sau boala Günther) este o afecţiune forte rară. Se întîlneşte la sugar imediat după naştere şi la copilul mic.

— Creşte excreţia urinară de uroporfirină I şi coproporfirină I. Urina proaspătă este roşie.

— Porfobilinogenul este absent în urină.

— Există o cantitate mare de porfirine în măduva oaselor (de unde şi denumirea de porfirie eritropoetică).

— Concentraţia de porfirine în ficat este mică.

Porfiria hepatică se prezintă sub două forme :

1. *Porfiria acută intermitentă* este o boală constituţională, care se observă mai ales la femeile între 20 şi 30 de ani.

Clinic se manifestă prin tulburări digestive (dureri abdominale de tip colică, constipaţie, vărsături), neurologice şi psihice.

Urinile sînt colorate intermitent în timpul crizei, cînd se elimină porfobilinogen, uroporfirina I şi III.

Porfirina din măduva oaselor este în cantitate normală, cea hepatică însă este foarte mult crescută.

Există cazuri cînd excreţia de uroporfirină în urină este normală, dar materiile fecale conţin de o sută de ori mai multe porfirine decît în mod normal (normal, în scaun 200—300 γ în 24 de ore). Porfirina se elimină prin bilă şi nu prin rinichi ; pentru acest motiv se vor cerceta porfirinele în scaun sau în lichidul duodenal.

2. *Porfiria cutanată tardivă a adultului* apare mai ales la bărbați și pare cîștigată. În etiologie se citează sifilisul, terapia cu metale grele, alcoolismul, insuficiența hepatică.

Clinic, caracteristică este prezența fotosensibilității.

Uroporfirina I și III crește în urină.

Culoarea roșie a urinii din porfirinurii poate fi întîlnită și în unele avitaminoze, datorită prezenței indirubinei. Trebuie avută în vedere și prezența posibilă a porfirinelor în urină sub formă de cromogeni incolori, astfel că culoarea normală a urinii nu exclude prezența porfirinelor.

TABELUL 80

Tablou comparativ între profiria congenitală și porfiria hepatică (după J. Bernard)

	Porfiria congenitală	Porfiria hepatică	
		Acută	Cutanată tardivă
Culoarea urinii proaspete	roșie	roșie în criză, apoi normală	roșie
Porfobilinogen	absent	prezent	absent
Uroporfirină	tip I	tipI și II	tip I și III
Porfirina în măduva oaselor	foarte crescută	normală	normală
Porfirina hepatică	foarte scăzută	foarte crescută	foarte crescută

EXPLORAREA SERIEI LEUCOCITARE ȘI TROMBOCITARE

I. TEHNICI

NUMĂRĂTOAREA LEUCOCITELOR

Principiu. Sîngele se diluează în pipetă specială cu un lichid de diluție care lizează eritrocitele, păstrînd numai elementele nucleate. Numărătoarea se face după principii identice cu ale eritrocitelor.

Material necesar:

- Material pentru recoltare prin înțepătură (descris la numărătoarea eritrocitelor).
- Pipetă pentru diluția leucocitelor.
- Cameră de numărat: Bürker, Goreaev, Bürker-Türck.
- Microscop.

Pipeta pentru numărătoarea leucocitelor (fig. 152) este formată dintr-un tub capilar cu zece gradații, cu notațiile 0,5 și 1, prelungit cu o bulă de diluție. Deasupra bulei se poate citi notația 11. Diluția sîngelui recoltat pînă la 0,5 este de 1/20 și recoltat pînă la 1 este de 1/10. Capacitatea reală a pipetei este de 11 volume, dar diluția este 1/10 și 1/20, datorită faptului că un volum de diluent rămîne în tubul capilar și nu diluează sîngele.

Despre camerele de numărat și întreținerea materialului: vezi numărătoarea de eritrocite.

Reactivul de diluție pentru leucocite:

– Acid acetic	1 ml
– Apă distilată	100 ml
– Albastru de metilen 1%	cîteva picături.

Tehnică. Recoltarea și umplerea camerei se face identic ca la eritrocite.

Se numără cîmpuri de cîte 1 mm pătrat: 25 de pătrate de 1/25 mm² sau întreg cîmpul de 1 mm², delimitat prin linii triple.

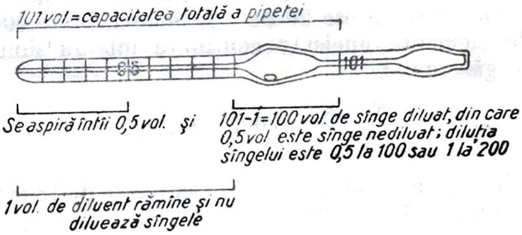
Dacă pe 5 mm² se găsesc 160 de leucocite, pe 1 mm² sînt 32 de leucocite. Dacă recoltarea se face pînă la notația 0,5, numărul de leucocite/mm³(N) este:

$N = 32 \times D \times I$, în care:

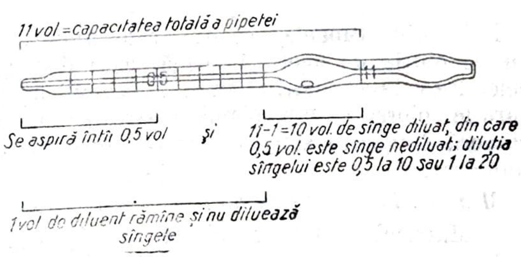
$D =$ diluția 1/20

$I =$ înălțimea camerei 1/10

au $32 \times 20 \times 10 = 6\,400$ leucocite/mm³.


101 vol.=capacitatea totală a pipetei
0,5
101
Se aspiră întîi 0,5 vol. și
101-1=100 vol. de sînge diluat, din care 0,5 vol. este sînge nediluat; diluția sîngelui este 0,5 la 100 sau 1 la 200
1 vol. de diluent rămîne și nu diluează sîngele

Pipetă de numărat eritrocitele


11 vol.=capacitatea totală a pipetei
0,5
11
Se aspiră întîi 0,5 vol și
11-1=10 vol. de sînge diluat, din care 0,5 vol. este sînge nediluat; diluția sîngelui este 0,5 la 10 sau 1 la 20
1 vol. de diluent rămîne și nu diluează sîngele

Pipetă de numărat leucocitele

Fig. 152. – Pipete pentru leucocite și eritrocite. Explicarea diluării sîngelui în pipetă pentru numărătoarea eritrocitelor și leucocitelor (după Gwandwohl).

Dacă recoltarea se face pînă la notația 1, numărul de leucocite/mm³ este:

$N =$ numărul de leucocite/1 mm² $\times D \times I$, în care:

D = diluția 1/10, iar I = înălțimea camerei 1/10; deci

$N = 64 \times 10 \times 10 = 6\,400$ leucocite/mm^3.

Rezultate normale:

Adult	5 000 – 9 000/mm^3
Sugar	8 000 – 12 000/mm^3
Nou-născut	12 000 – 20 000/mm^3

Erorile de determinare sînt descrise la numărătoarea eritrocitelor.

Corecția rezultatelor în numărătoarea leucocitelor în caz de eritroblastoză

În camera de numărătoare este imposibil să se facă deosebirea între un leucocit și un eritroblast. Numărul găsit nu reprezintă deci numărul de leucocite, ci suma leucocitelor și eritroblaștilor, adică a elementelor nucleate. Eritroblaștii sînt numărați în formula leucocitară și raportați la 100 de elemente albe.

Exemplu: numărul de elemente nucleate numărat în cameră este de 18 000/mm^3, iar formula leucocitară arată 20 de eritroblaști la 100 de leucocite. Deci, dacă la 120 de elemente nucleate se găsesc 20 de eritroblaști, la 18 000 de elemente nucleate conținute într-un mm^3 se găsesc:

$$\frac{18\,000 \times 20}{120} = 3\,000 \text{ eritroblaști}$$

Deci, numărul real de leucocite este de 18 000 – 3000 = 15 000/mm^3.

NUMĂRĂTOAREA ÎN CAMERĂ A EOZINOFILELOR

Principiu. Sîngele recoltat este amestecat cu o soluție de acetonă-eozină, care distruge celelalte celule, păstrînd numai eozinofilele, pe care le colorează slab. Numărătoarea se face în cameră Nageotte sau în cameră obișnuită de numărat.

Material necesar:

- Material pentru recoltare în picătură
- Pipetă pentru recoltarea leucocitelor
- Cameră de numărat Nageotte (sau Bürker, Goreaev)
- Microscop.

Reactivul acetonă-eozină

Eozină soluție apoasă 2%	5 ml
Acetonă	5 ml
Apă distilată	90 ml

Soluția se conservă în frigider la +4°, se filtrează înainte de folosire; nu se mai poate întrebuința după 15 zile de la preparare.

Camera Nageotte are înălțimea de 0,5 mm și este împărțită în 40 de dreptunghiuri. Fiecare dreptunghi are un volum de 1,25 mm^3. Se numără celulele din 4 dreptunghiuri. Cifra găsită se împarte la 5 și se înmulțește cu diluția sîngelui, aflîndu-se numărul de elemente/mm^3.

Tehnica. Se recoltează sîngele pînă la diviziunea 1 în pipetă de leucocite, apoi se diluează cu soluția acetonă-eozină pînă la diviziunea 11 (diluție 1/10). Se agită pipeta de 30 de ori și după 3 minute se umple celula Nageotte cu conținutul din pipetă. Se lasă să se sedimenteze și apoi se face numărătoarea. Eozinofilele cu granulațiile lor strălucitoare se disting net pe fondul colorat în roz, în timp ce toate celelalte leucocite se văd numai ca niște umbre.

Numărătoarea se va face în limitele acestui timp, deoarece eozinofilele se distrug și ele mai tîrziu. Se numără elementele din 4 dreptunghiuri, cifra obținută se împarte la 5 și se înmulțește cu 10 (diluția 1/10).

Rezultate. Normal se găsesc cifre care variază între 100 și 200 elemente/mm^3.

Eozinofilele variază în următoarele împrejurări:

— eozinofilie: stări alergice, hipervagotonie;

— eozinopenie: boli infecțioase, arsuri, șoc postoperator, după administrare de clorhidrat de colină, adrenalină, pituitrină, ACTH, hormoni corticosuprarenali.

TESTUL THORN

Principiu. Hormonii corticosuprarenali de tipul glicocorticoizilor produc o scădere a eozinofilelor circulante la indivizii normali cu cortexul suprarenal intact. Sub influența hormonului adrenocorticotrop hipofizar (ACTH) se produce o secreție crescută a hormonilor corticali de tipul cortizonului și, cu aceasta, o scădere a eozinofilelor. În caz de insuficiență corticosuprarenală scăderea eozinofilelor nu se produce.

Metodă. Bolnavul rămîne nemîncat de la ora 18 seara pînă la terminarea probei, a doua zi la ora 12. La ora 8 se efectuează numărătoarea directă a eozinofilelor în cameră. Se injectează 25 mg ACTH intramuscular. La ora 11 și la ora 12, adică la 3 și 4 ore după injecție se determină din nou numărul eozinofilelor.

Interpretare. În mod normal, la 4 ore după injecția cu **ACTH** scăderea eozinofilelor este de 50–60% din valoarea inițială (test Thorn pozitiv). Dacă scăderea este mai mică de 50% (test Thorn negativ), existența unei insuficiențe corticosuprarenale primare este foarte probabilă. Trebuie însă reținut că un test Thorn negativ se întîlnește și în cazul insuficienței lobului anterior hipofizar cu insuficiență corticosuprarenală secundară, ca și în hipotiroidii. Uneori eozinofilele ajung la valoarea lor cea mai scăzută la 3 ore după injecție, iar la 4 ore sînt vizibil în creștere.

Surse de eroare. Testul nu este valabil la valori inițiale sub 80 sau peste 600 eozinofile/mm^3.

Pipeta nu trebuie agitată cu putere, ci mișcată încet, dintr-un sens într-altul. Pînă la numărătoare nu trebuie să treacă mai puțin de un minut și jumătate și nici mai mult de 5 minute.

NUMĂRĂTOAREA TROMBOCITELOR

METODA FONIO

Principiu. Este o metodă de numărătoare indirectă: se stabilește procentajul trombocitelor față de eritrocite, pe un frotiu colorat, apoi se raportează la numărul de eritrocite, pentru a afla numărul de trombocite/mm^3.

Material și reactivi:

- Material pentru recoltarea sîngelui prin înțepătură.
- Soluție de sulfat de magneziu 14%.
- Reactivi pentru colorația panoptică.

Tehnica. Se înțeapă pulpa degetului, apoi, pe locul înțepăturii, se aplică o picătură de soluție de sulfat de magneziu 14%. Printr-o ușoară presiune, prin locul înțepăturii iese o picătură de sînge direct în picătura de sulfat de magneziu. Se amestecă cu vîrful unei lame ambele picături și după ce sînt omogenizate, se întind frotiuri subțiri, care se colorează cu colorația panoptică May-Grünwald-Giemsa, prelungită 40–50 de minute (soluția de sulfat de magneziu împiedică aglutinarea spontană a trombocitelor).

Numărătoarea. Se numără pe frotiu trombocitele întîlnite la 1 000 de eritrocite și, cunoscînd numărul de eritrocite/mm^3, printr-o regulă de trei se află numărul de trombocite/mm^3.

Exemplu: s-au numărat 40 de trombocite la 1 000 de eritrocite, numărul de eritrocite fiind de 4 000 000/mm^3; deci, numărul de trombocite = = 160 000/mm^3.

Valori normale = 130 000–300 000 trombocite/mm^3.

Pentru ușurarea numărătoarei se aplică în diafragmul ocularului o rondelă de hîrtie, cu o fereastră tăiată în pătrățel, pentru limitarea cîmpului microscopic.

NUMĂRĂTOAREA TROMBOCITELOR PRIN METODE DIRECTE

Principiu. Se folosesc soluții diluante, care au proprietatea de a liza eritrocitele și de a împiedica aglutinarea spontană a trombocitelor. Numărătoarea se face în camerele de numărat eritrocite.

Soluția Feissly:

Clorhidrat de cocaină	4	g
Clorură de sodiu	0,02	g
Apă distilată	100	ml

Tehnica. Într-o pipetă de leucocite se aspiră sînge pînă la diviziunea 0,5, apoi lichidul Feissly pînă la 11 (diluție 1/20). Se agită bine, apoi se încarcă camera de numărat, după aruncarea primelor picături. Se așteaptă 20 de minute, pentru sedimentarea trombocitelor și liza eritrocitelor. Se examinează la microscop. Se recomandă microscopul cu contrast de fază. Se poate examina și la microscopul obișnuit cu obiectiv mare uscat, ocular 10, ca pentru numărătoarea de eritrocite. În cazul că se lucrează la microscopul obișnuit, se recomandă adăugarea în soluția Feissly a 50–100 mg sulfat de albastru de Nil. Se poate lucra însă și cu soluția ca atare, fără să fie necesară adăugarea acestui colorant. Trombocitele apar ca niște puncte refringente, la mișcarea vizei micrometrice, așezate pe cîmpul rețelei de numărat. Pe cîmp se mai întîlnesc și eritrocite care încă nu s-au lizat, dar care nu jenează numărătoarea trombocitelor. Se numără trombocitele de pe mai mulți mm^2 și se raportează la 1 mm^3, calculul făcîndu-se ca la numărătoarea de eritrocite.

Valori normale: 150 000–300 000 de trombocite/mm^3.

NUMĂRĂTOAREA DIRECTĂ SIMULTANĂ A TROMBOCITELOR ȘI LEUCOCITELOR PRIN METODA CHRISTENSEN

Reactivi:

Soluția I:	Albastru briliant de crezil	0,20	g
	Citrat de sodiu	1	g
	Sublimat	2	mg
	Apă distilată	100	ml
Soluția II:	Uree	20	g
	Apă distilată pînă la	100	ml

Soluțiile I și II se filtrează și se conservă separat, în frigider; dacă prin învechire apar precipitate, soluțiile nu mai pot fi utilizate. Înainte de întrebuințare se amestecă 3 părți soluție I și 4 părți soluție II. Acest amestec poate fi folosit cîteva zile. Diluția sîngelui cu amestecul de mai sus se face în pipeta de leucocite. După ce se agită, se lasă 10 minute, apoi se numără în cameră leucocitele și trombocitele.

NUMĂRĂTOAREA DIRECTĂ A TROMBOCITELOR PRIN METODA HÖGEDUS

Cu o micropipetă se pipetează 0,1 ml sînge venos sau din pulpa degetului, care se amestecă cu 0,9 ml citrat trisodic soluție 3,8%. Amestecul se face într-o eprubetă subțire de hemoliză sau într-un tub de hemoglobinometru Sahli. Se lasă în poziție verticală aproximativ 1—2 ore.

Eritrocitele se sedimentează ușor, lăsînd în partea de sus o coloană mică de lichid alb transparent. Cu ajutorul unei pipete Pasteur se ia o picătură din acest lichid supernatant și se umple camera de numărătoare în mod obișnuit. După aproximativ 15—20 de minute, necesare pentru sedimentare, se numără trombocitele. Metoda este simplă și permite să se obțină o suspensie de trombocite aproape lipsită de eritrocite.

Numărul găsit în 1 mm^3 se înmulțește cu 10 (diluția inițială a sîngelui) și se află numărul de trombocite/mm^3.

Normal = 150 000 — 300 000 trombocite/mm^3.

STUDIUL MORFOLOGIC AL TROMBOCITELOR

Morfologia trombocitelor se studiază pe frotiuri colorate cu May-Grünwald-Giemsa, recoltate pentru formula leucocitară.

Pe frotiul obișnuit, în mod normal, trombocitele sînt aglutinate în grupuri de cîte 2—3 sau mai multe elemente; în caz de trombocitopenie sau trombocitopatie lipsește această *aglutinabilitate spontană*, elementele fiind izolate.

Normal, diametrul trombocitelor este cuprins între 2 și 4 μ.

Se pot întîlni macrotrombocite, celule care ating și depășesc 6 μ.

EXAMENUL MORFOLOGIC AL SÎNGELUI

ÎNTINDEREA FROTIULUI

Principiu. Se întinde o picătură de sînge proaspăt recoltat pe o lamă, în strat subțire, în așa fel încît elementele să nu fie suprapuse, pentru a cerceta elementele figurate după colorarea cu metoda obișnuită panoptică.

Material necesar :

— Material pentru recoltarea în picătură

— Lame

Tehnica întinderii frotiului (fig. 153). Se recoltează o picătură proaspătă de sînge pe marginea unei lame șlefuite; lama se aplică pe o lamă orizontală, în așa fel, încît picătura de sînge să se întindă, prin capilaritate, la marginea de contact dintre cele două lame care fac un unghi de aproximativ 30°. Se imprimă apoi lamei șlefuite o mișcare de translație ușoară, ceea ce permite sîngelui să se întindă într-un strat subțire. Imediat după întinderea frotiului lama se agită pentru uscare imediată la aer. În lățime, frotiul trebuie să aibă două margini paralele, ceea ce se poate obține prin întinderea sîngelui cu o lamă șlefuită cu un colț rupt sau prin întinderea lamei înainte ca picătura de sînge să cuprindă, prin capilaritate, întregul unghi dintre cele două lame. Frotiul trebuie să fie subțire, pentru ca elementele să nu fie suprapuse.

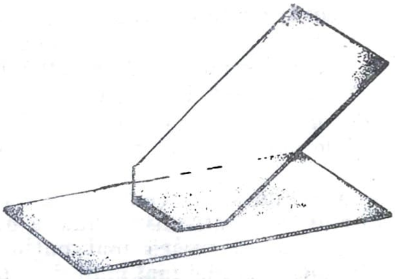


Fig. 153. — Întinderea frotiului de sînge.

Obținerea unui bun frotiu necesită în primul rînd un material de sticlă curat, bine degresat.

După recoltare, frotiul trebuie colorat cît mai curînd. În lamele nefixate și necolorate celulele se alterează, pierzîndu-și afinitatea tinctorială.

COLORAREA FROTIURILOR DE SÎNGE ȘI MĂDUVĂ

Noțiunile clasice privind bazofilia citoplasmei elementelor tinere, afinitatea tinctorială a granulațiilor granulocitelor, acidofilia eritrocitelor mature reprezintă criterii solide, pe baza cărora se stabilește clasa unui element sau gradul lui de maturație.

Acum se utilizează aproape exclusiv colorarea dublă cu soluția May-Grünwald-Giemsa, care dă unele indicații asupra compoziției chimice a substanței vii celulare.

Acidofilia granulațiilor eozinofile se datorește alcalinității (pH=11) acestor granulații. O celulă bazofilă are pH acid și se colorează cu substanțele bazice. Eritrocitul ortocromatofil are pH între 4 și 5, iar eritrocitul policromatofil are pH mai acid, aproape de 3.

Coloranții utilizați în hematologie se împart în simpli și compuși, în acizi, bazici și neutri.

Coloranți acizi : eozină.
Coloranți bazici : albastrul de metilen, azurul de metilen, violetul de metilen.
Coloranți neutri : eozinat de albastru de metilen, eozinat de azur de metilen.

Metoda de colorație panoptică May-Grünwald-Giemsa indică pH componentelor celulare. Astfel, porțiunile acide ale celulei fixează coloranții bazici, sînt deci bazofile; părțile alcaline fixează coloranții acizi, sînt acidofile. Așa, de exemplu, eritroblastul bazofil, care conține în citoplasmă acid ribonucleic, se colorează în albastru, fixînd albastrul de metilen; nucleul conține acid dezoxiribonucleic, deci fixează și se colorează prin azur de metilen; granulațiile eozinofile, care sînt alcaline (pH=11), fixează coloranții acizi, eozina.

Nucleii celulelor sînt bogați în acizi nucleici :

– acidul ribonucleic se găsește, atît în citoplasmă, cît și în nucleu;

– acidul dezoxiribonucleic (timonucleic) se găsește exclusiv în nucleu.

Ambii acizi nucleici dau azurofilia nucleului prin colorația Romanovski-Giemsa. Nucleolul conține acid ribonucleic de tip citoplasmatic, fixînd albastrul de metilen.

Cu cît o celulă este mai tînără, citoplasma ei este mai bazofilă, prin faptul că în elementele mai tinere se găsește o concentrație mai mare de acid ribonucleic. Cu cît o celulă devine mai matură concentrația în acid ribonucleic scade, ceea ce se traduce prin pierderea bazofiliei și apariția acidofiliei (evoluția eritroblaștilor poate fi luată ca exemplu). Limfocitele conțin în citoplasmă o cantitate mică de acid ribonucleic, pe cînd plasmocitele, o cantitate mare.

Termenii de eozinofil, oxifil sau acidofil reprezintă sinonime care indică afinitatea față de coloranții acizi.

Compoziția colorantului panoptic și rezultatele obținute după afinitatea citochimică a părților componente celulare :

Soluția May-Grünwald :

Eozinat de albastru de metilen	1	g
Glicerină neutră p.a.	50	ml
Alcool metilic p.a.	100	ml

Soluția Giemsa :

Eozinat de azur de metilen	3	g
Azur de metilen	0,8	g
Glicerină neutră p.a.	250	ml
Alcool metilic	200	ml

Părțile componente ale celulei	Soluție May-Grünwald	Soluție Giemsa	Culori
Granulocite :			
— Neutrofil .	+	—	Brun
— Eozinofil. .	+	+	Portocaliu
— Bazofil . . .	+	+	Albastru închis-negru
Eritrocit	+	+	Roz-roșiatic
Nucleul	—	+	Violaceu de diferite intensități
Citoplasma	+	+	Neutrofile : roz L = M = { albastră
Granulații azurofile.	—	+	Roșu-violet
Hematozoar . . .	—	+	Roșu-violet

Semnul + = colorează ; semnul — = nu colorează.

TEHNICA COLORĂRII PANOPTICE

Reactivi și materiale necesare :

— Soluția May-Grünwald.
— Soluția Giemsa.
— Apă distilată neutră.
— Pipete Pasteur, pipete gradate.

Apa distilată trebuie să fie o apă neutră cu pH 7 sau 7,2. Apa neutră se obține prin neutralizarea apei distilate, care de obicei este acidă. Neutralizarea se poate face cu o soluție slabă alcalină de carbonat de sodiu 1%, cîteva picături la 500 ml apă distilată, încercîndu-se pH cu un indicator universal de hîrtie sau cu hematoxilină. Se pune apa de controlat într-o eprubetă și se adaugă cîteva cristale de hematoxilină; dacă se obține o culoare roz, apa este neutră (hematoxilina este violet-albastră în mediu alcalin și galbenă în mediu acid).

Pentru malariologie se utilizează o apă ușor alcalină.

Folosirea apei tamponate. Se folosește un tampon fosfat cu pH = 7,2 :

PO_4H_2K	0,49 g
$PO_4H\ Na_2$	1,14 g
Apă distilată	200 ml

1 parte tampon +9 părţi apă.

Folosirea unui tampon fosfat cu pH = 6,8 ne-a dat rezultate mai bune.

Tampon pH = 6,8 :

I.	PO_4H_2K	M/15	0,90 g%
II.	$PO_4H\ Na_2$	M/15	1,18 g%

Se amestecă soluţia I cu soluţia II în părţi egale.

Se foloseşte 1 parte tampon cu 9 părţi apă.

Pentru fiecare soluţie-tampon pH trebuie verificat colorimetric sau electroionometric. Dacă pH nu este cel dorit, se va corecta pînă la pH dorit, adăugînd fie soluţie I, fie soluţie II peste amestec, după cum amestecul este mai alcalin sau mai acid, ajustîndu-se prin tatonare sub controlul pH.

Fixarea. Se acoperă frotiul cu un număr cunoscut de picături din soluţia May-Grünwald, se lasă 2—3 minute.

Colorarea se face în 2 timpi :

Timpul 1 . Se adaugă peste soluţia May-Grünwald un număr egal de picături de apă tamponată, se omogenizează şi se lasă în repaus 2 minute, în care timp soluţia May-Grünwald devine colorantă.

Timpul 2. Se varsă soluţia de pe lamă şi, fără să se spele, se acoperă cu soluţia Giemsa diluată în proporţia de 1 picătură soluţie Giemsa pentru 1 ml apă tamponată. Soluţia Giemsa se lasă 20—30 de minute. Apoi lama se spală la robinet sub jet puternic de apă. Se şterge dosul lamei, lăsînd-o la uscat în stativ, la aer. Dacă soluţia Giemsa colorează slab diluţia, se va face cu 2 picături pentru 1 ml apă.

Dacă apa folosită este alcalină eritrocitele apar albastre, iar dacă este prea acidă apar roşu aprins ; în ambele cazuri granulaţiile nu se pot colora bine.

Colorarea pentru trombocite se face la fel, prelungind timpul de colorare cu Giemsa la 45 de minute. Spălarea lamei pentru trombocite se face uşor, fără jet, deoarece un jet puternic de apă antrenează din trombocite.

Prepararea soluţiei May-Grünwald-Giemsa amestecată : amestec panoptic (Virgil Ionescu)

Atunci cînd avem substanţe în stare de pulbere se foloseşte următorul amestec :

May-Grünwald	pulbere	1 g
Giemsa	pulbere	2 g
Alcool metilic	p. a.	1 000 ml

Amestecul se lasă 24 de ore la 37°, în sticlă bine închisă cu un dop rodat.

Tehnica de colorare cu amestecul panoptic.

— Se acoperă lama cu amestec timp de 2—3 minute.

— Apoi se adaugă peste amestec apă tamponată (neutră) în cantitate dublă decît amestecul. Se omogenizează şi se lasă 10—15 minute. Se spală cu jet de apă de robinet şi se şterge dosul lamei. Se lasă să se usuce în poziţie verticală.

Rezultatele sînt identice cu cele obţinute cu prima tehnică.

FORMULA LEUCOCITARĂ

Formula leucocitară reprezintă raportul procentual al leucocitelor pe frotiul sîngelui periferic după numărarea a cel puţin 200 de elemente.

Tehnica. Se pune o picătură de ulei de cedru pe lamă şi se pune la punct microscopul, folosind obiectivul cu imersie, diafragmul deschis, condensatorul sus. Lama va fi deplasată în aşa fel încît marginea frotiului să fie examinată în zig-zag ; se începe cu extremitatea (în sensul lungimii) frotiului, deplasarea făcîndu-se într-o singură direcţie, pentru a nu citi de două ori aceeaşi regiune. Pe măsură ce se întîlnesc leucocitele, se notează pe un tabel în dreptul simbolului, notaţia făcîndu-se pe grupe de cîte 5.

Granulocite neutrofile nesegmentate	NN	=	1— 4%
Granulocite neutrofile segmentate	NS	=	60—70%
Granulocite eozinofile	Eo	=	1— 4%
Granulocite bazofile	B	=	0— 1%
Limfocite	L	=	25—35%
Monocite	M	=	4— 8%

Se numără în total 200 de elemente sau mai multe şi se face procentajul fiecărei clase.

Cifra absolută. Calcularea cifrei absolute, adică a numărului de fiecare din elemente pe mm ^{3}, arată variaţiile reale.

Exemplu : pentru un număr de leucocite de 6 200 elemente/mm ^{3}, dacă formula arată 70% neutrofile segmentate, cifra absolută se calculează după regula de trei.

Dacă la 100 elemente se găsesc 70 neutrofile segmentate, pentru 6 200 se găsesc $70 \times 62 =$ $= 4\,340/\text{mm}^3$.

Cifre absolute normale

— Neutrofile nesegmentate	50— 320/mm^3
— Neutrofile segmentate	2 500—4 800/mm^3
— Eozinofile	100— 200/mm^3
— Bazofile	25— 80/mm^3
— Limfocite	1 250—2 400/mm^3
— Monocite	300— 640/mm^3

Formula Arneth

Se face un tabel clasificînd granulocitele neutrofile în 5 categorii, în funcție de numărul de lobi ai nucleului, numărînd 200 elemente și făcînd proporția la 100 (a se vedea capitolul: „Studiul morfologic al seriei leucocitare").

Indicele de deviere nucleară

(*Schilling*)

$$\text{I.D.N.} = \frac{\text{neutrofile nesegmentate}}{\text{neutrofile segmentate}} = \frac{4}{64} = \frac{1}{16}$$

$$\text{normal} = \frac{1}{16} = 0{,}06.$$

(A se vedea capitolul: „Studiul morfologic al seriei leucocitare").

EVIDENȚIEREA GRANULAȚIILOR TOXICE ALE NEUTROFILELOR

Colorarea frotiului se face cu soluție Giemsa, în care apa este înlocuită cu o soluție tampon de pH 5,4.

Tampon Momsen pH 5,4

NaOH N	21,6 ml
Acid acetic N	25 ml
Apă distilată pînă la	100 ml

Tehnica:

— Fixare cu alcool metilic 10 minute.

— Colorare cu soluție Giemsa, 3 picături la 1 ml tampon, timp de 60—90 de minute. Spălare.

Rezultate: granulații foarte mari intens colorate în albastru închis; granulațiile neutrofile nu se colorează cu această metodă.

PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A PEROXIDAZELOR ȘI OXIDAZELOR

Principii generale. În respirația aerobă, oxigenul nu poate să producă oxidarea fără intervenția unui catalizator.

Oxidazele permit ca substratul să utilizeze oxigenul din mediul înconjurător, astfel încît pentru punerea în evidență a oxidazelor nu este necesară prezența unei substanțe oxidante.

Peroxidazele eliberează oxigenul din peroxizi și îl cedează substratului oxidabil. Punerea în evidență a peroxidazelor necesită prezența apei oxigenate, care să cedeze oxigenul.

REACȚIA PEROXIDAZELOR (după Sato)

Reactivi:

— Soluție de sulfat de cupru 0,5%

— Benzidină

— Apă oxigenată (2 ml perhidrol + 10 ml apă)

— Safranină soluție 1%.

Tehnica. Se acoperă lama cu soluția de sulfat de cupru 0,5% timp de 30 de secunde — 1 minut. Se varsă soluția de SO_4Cu, nu se spală și se acoperă lama cu amestecul de benzidină și apă oxigenată 2 minute:

Benzidină cristale	0,2 g
Apă distilată	100 ml
Apă oxigenată	2 picături

Se spală cu apă, se colorează lama cu safranină 1% 3 minute. Se spală, se usucă.

La nivelul celulei peroxidazele eliberează oxigenul din peroxid (H_2O_2) și îl cedează substratului, care este benzidină; aceasta, prin oxidare, trece în albastru de benzidină, dînd colorația albastră caracteristică (fig. 154). Sulfatul de cupru este catalizator.

Rezultate. Reacția peroxidazelor este pozitivă pentru celulele seriei granulocitare, începînd cu promielocitul. Mieloblastul nu conține peroxidaze decît într-o fază mai evoluată către promielocit.

Dintre monocite, majoritatea elementelor dau reacții slab pozitive, iar unele sînt complet negative.

Limfocitele dau reacția negativă.

Eritrocitele, plasmocitele, celulele reticulo-histiocitare nu conțin peroxidaze.

Uneori, unele celule reticulo-histiocitare dau reacții slab pozitive, și anume după ce au fagocitat elemente mieloice.

REACȚIA PEROXIDAZELOR

(Graham-Knoll)

Reactivi:

— Soluție alcoolică de formol 10%: 10 părți formol 40% pentru 90 de părți alcool de 96°.

— Soluție de benzidină: 30—50 mg de benzidină se dizolvă în 6 ml alcool de 96° diluat cu 4 ml apă; se adaugă 0,02 ml apă oxigenată. Soluția se închide cu dop de sticlă; se poate conserva 5 zile.

— Soluție Giemsa.

Frotiurile nu trebuie să fie mai vechi de două zile.

Tehnica:

1. Fixare, timp de 30 de secunde precis, în soluţia alcoolică de formol; uscare la aer; spălare cu apă curentă şi iar uscare.
2. Se acoperă lama cu soluţia de benzidină, timp de 5 minute; apoi se efectuează spălarea cu apă curentă şi uscarea.
3. Colorare cu Giemsa, timp de 30—40 de minute. Spălare şi uscare.

Rezultat pozitiv: granulaţii galbene-verzui spre brune.

REACŢIA PENTRU OXIDAZE

Principiu. Se bazează pe sinteza albastrului de indofenol în prezenţa oxidazelor.

Material necesar:

— Formol 40%
— Alcool absolut
— α-naftol
— Hidrat de sodiu
— Ser fiziologic
— Paradimetil-parafenilen-diamină (bază).

Tehnica:

— Fixare cu: Formol 40% } în părţi egale
Alcool absolut }
timp de 2 ore.

— Colorare cu soluţia I + soluţia II.

Soluţia I

α-naftol	1 g
NaOH N/10	1 ml
Ser fiziologic	100 ml

Se fierbe serul fiziologic. În timpul fierberii se adaugă 1 g α-naftol şi 1 ml NaOH N/10 picătură cu picătură. La răcire se filtrează. Se păstrează la întuneric maximum 4 săptămîni.

Soluţia II

— Paradimetil-parafenilen-diamină (bază)	1 g
— Ser fiziologic	100 ml

Amestecul se întrebuinţează după 2—3 zile. Se păstrează 2—3 săptămîni.

Colorarea. Se amestecă 1 volum soluţie I cu 4 volume soluţie II. Se filtrează. Lamele fixate se lasă 3 minute în amestecul colorant. Se spală cu apă, se usucă. Se colorează nucleii cu safranină 1%, 2—3 minute.

Rezultate: identice cu cele de la peroxidaze; interpretarea la fel.

Determinările oxidazelor sau peroxidazelor servesc la diferenţierea între elementele mieloice de cele limfocitare: problema se pune cînd morfologia singură nu permite această diferenţiere. Morfologic este imposibil de a deosebi, de cele mai deseori, o leucoză cu micromieloblaşti de o leucoză limfoidă. Uneori unii micromieloblaşti dau reacţia peroxidazelor pozitivă şi atunci se exclude seria limfocitară. Paramieloblaştii dau reacţia peroxidazelor pozitivă inconstant. O reacţie negativă nu exclude deci prezenţa paramieloblastului. O reacţie pozitivă exclude însă prezenţa seriei limfocitare.

Se admite că paramieloblaştii, care dau reacţia peroxidazelor negativă, provin din focarele de metaplazie extramedulare. Cei care dau reacţia pozitivă provin din măduva hematogenă unde, fie prin fagocitoza elementelor granulocitare, fie datorită mediului de dezvoltare capătă acest caracter.

COLORAŢIA CU ALBASTRU DE TOLUIDINĂ PENTRU BAZOFILE

Principiu. Granulaţiile bazofilului circulant sau ale mastocitului se colorează metacromatic cu albastru de toluidină.

Reactiv. Soluţie saturată de albastru de toluidină (aproximativ 1%) în alcool metilic.

Tehnica. Fixare şi colorare simultană a frotiului cu soluţia de albastru de toluidină timp de 5 minute. Spălare, uscare.

Rezultate. Eritrocitele apar colorate în albastru-verzui, leucocitele în albastru palid, granulaţiile bazofile în violet-roşu.

O uşoară metacromazie pot da şi granulaţiile azurofile ale promielocitului, monocitului sau trombocitului.

CERCETAREA FOSFATAZEI ALCALINE

Principiu. Substratul glicerofosfatic este clivat sub influenţa enzimei, punînd în libertate ioni fosforici, care cu nitratul de calciu dau fosfat de calciu. Fosfatul de calciu este transformat în fosfat de cobalt, iar acesta din urmă în sulfură de cobalt, de culoare neagră.

Tehnică

1. Frotiul de sînge sau de măduvă se fixează timp de 30 de secunde într-un amestec format din 10 ml formol şi 90 ml alcool metilic absolut.

2. Se spală pentru cîteva secunde, apoi se incubează timp de 2 ore la 37° într-o soluţie de substrat tamponat proaspăt preparată, care conţine:

Veronal sodic 10%	30 ml
β-glicerofosfat de sodiu 3%	30 ml
Sulfat de magneziu M/10	30 ml
Nitrat de calciu 2%	45 ml
Apă distilată	165 ml

3. Se spală frotiul cîteva secunde în apă distilată conținînd cîteva picături de soluție 2% de nitrat de calciu.

4. Se cufundă lama într-o soluție de 2% nitrat de cobalt pentru 5 minute.

5. Se spală bine, apoi se acoperă lama pentru 10 secunde cu o soluție slabă de sulfură de amoniu (circa 1 ml sulfură de amoniu pentru 80 ml apă).

6. Se spală bine și se colorează cu o soluție apoasă de 2% safranină timp de 10 secunde.

7. Se spală bine, se usucă la aer.

Rezultate. Activitatea fosfatazei alcaline se prezintă sub forma de granule negre (fig. 155) în citoplasma granulocitelor neutrofile segmentate. Limfocitele, monocitele, eozinofilele, plasmocitele și celulele tinere, blastice, nu prezintă activitate fosfatazică alcalină.

Activitatea fosfatazică se exprimă, în funcție de numărul și mărimea granulelor, în: absentă, slab pozitivă, intens pozitivă. Se cercetează 400 de granulocite neutrofile segmentate și se notează procentajul celulelor cu reacție intens pozitivă, procentajul celulelor cu reacție slab pozitivă și al celulelor cu activitate fosfatazică absentă.

Interpretare. În mod normal, granulocitele segmentate neutrofile prezintă o slabă activitate fosfatazică alcalină.

În reacții leucemoide privind seria granulocitară, ca: infecții acute, infecția tuberculoasă, carcinomatoză, policitemie adevărată, anemii hemolitice, activitatea fosfatazică este considerabil crescută.

De asemenea, activitatea fosfatazică alcalină este crescută în mieloscleroză.

Spre deosebire de aceste afecțiuni, în leucoza mieloidă, activitatea fosfatazică alcalină este mică sau absentă și nu se întîlnesc celule cu reacții pozitive intense.

TABELUL 81

Procentajul celulelor cu activitate fosfatazică
(după B. I. Leonard și colab.)

	Activitate intensă		Activitate slabă		Absență de activitate	
	limite	medie	limite	medie	limite	medie
Normal	0–2	1	14–82	18	25–90	82
Leucoză mieloidă cronică	0–1	1	0–24	6	75–100	92
Reacție leucemoidă	25–92	60	10–17	37	0–14	6
Policitemie adevărată	30–95	65	5–65	32	0–6	3

Această reacție citochimică permite să se facă deosebirea între leucoza mieloidă cronică și reacțiile leucemoide privind seria granulocitară.

REACȚIA FEULGEN

Principiu. Reacția servește la identificarea citochimică a acidului dezoxiribonucleic. În cursul reacției se produce o hidroliză a structurii moleculare a cromatinei. La 60° grupul purinelor se separă de acizii nucleici, eliberînd grupări aldehidice reductoare, care se combină cu acidul fucsin-sulfuros (reactiv Schiff) pentru a forma un colorant roșu-violet intens.

Reactivi:

1. Acid clorhidric normal p. a. (ClH 37% cu densitate 1,19, 84 ml la 1 000 ml apă).

2. Alcool metilic.

3. Acid fucsin-sulfuros (reactiv Schiff): 1 g de fucsină bazică, fin pulverizată, se dizolvă în 200 ml apă distilată la fierbere, agitînd mereu. După ce se răcește pînă la 50°, se filtrează, apoi se adaugă 20 ml acid clorhidric normal; se răcește soluția pînă la 25° și se adaugă 1 g de sulfit acid de sodiu (bisulfit de sodiu) anhidru (SO_3HNa p.a.).

Se lasă soluția timp de 24 de ore la temperatura camerei la întuneric. Se adaugă 2 g cărbune activ, se agită timp de 1 minut, apoi se filtrează imediat. Soluția este incoloră, uneori rămîne o nuanță ușor galbenă. Se păstrează ermetic închisă, la întuneric și la frigider. Dacă virează spre roșu, soluția devine inutilizabilă. Înainte de utilizare se lasă să se încălzească la temperatura camerei.

4. Soluția de spălare (apa sulfuroasă):

sulfit acid de sodiu 10%	10 ml;
acid clorhidric N	10 ml;
apă distilată	200 ml.

Amestecul dă un puternic miros de bioxid de sulf; se prepară extemporaneu.

Tehnica:

1. Se fixează frotiul la flacără.

2. Se cufundă lama rapid în acid clorhidric normal, rece.

3. Se hidrolizează apoi timp de 4 minute într-o soluție normală de acid clorhidric, la temperatura de 60° precis.

4. Se trece apoi imediat într-o soluție normală de acid clorhidric rece, timp de 1–3 minute.

5. Apoi se ține 2 minute în apă distilată rece.

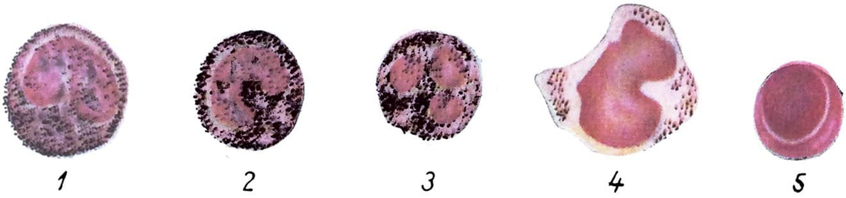


Fig. 154. — Reacţia peroxidazelor : pozitivă, în seria granulocitară (*1—3*) şi la monocit (*4*) negativă la limfocit (*5*).

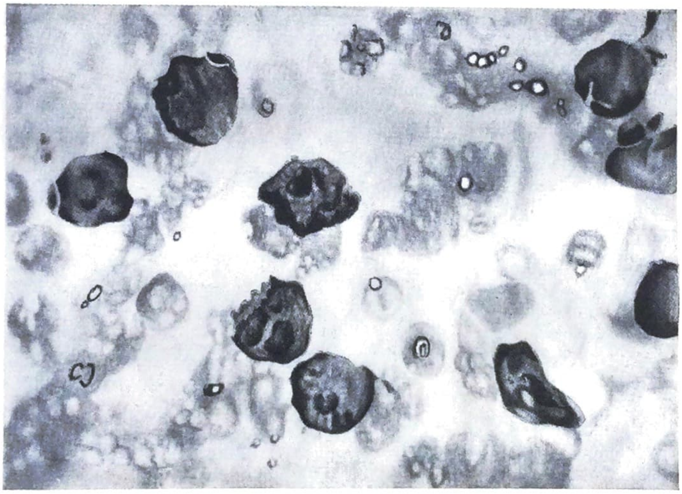


Fig. 155. — Activitate fosfatazică alcalină pozitivă. Stare leucemoidă.

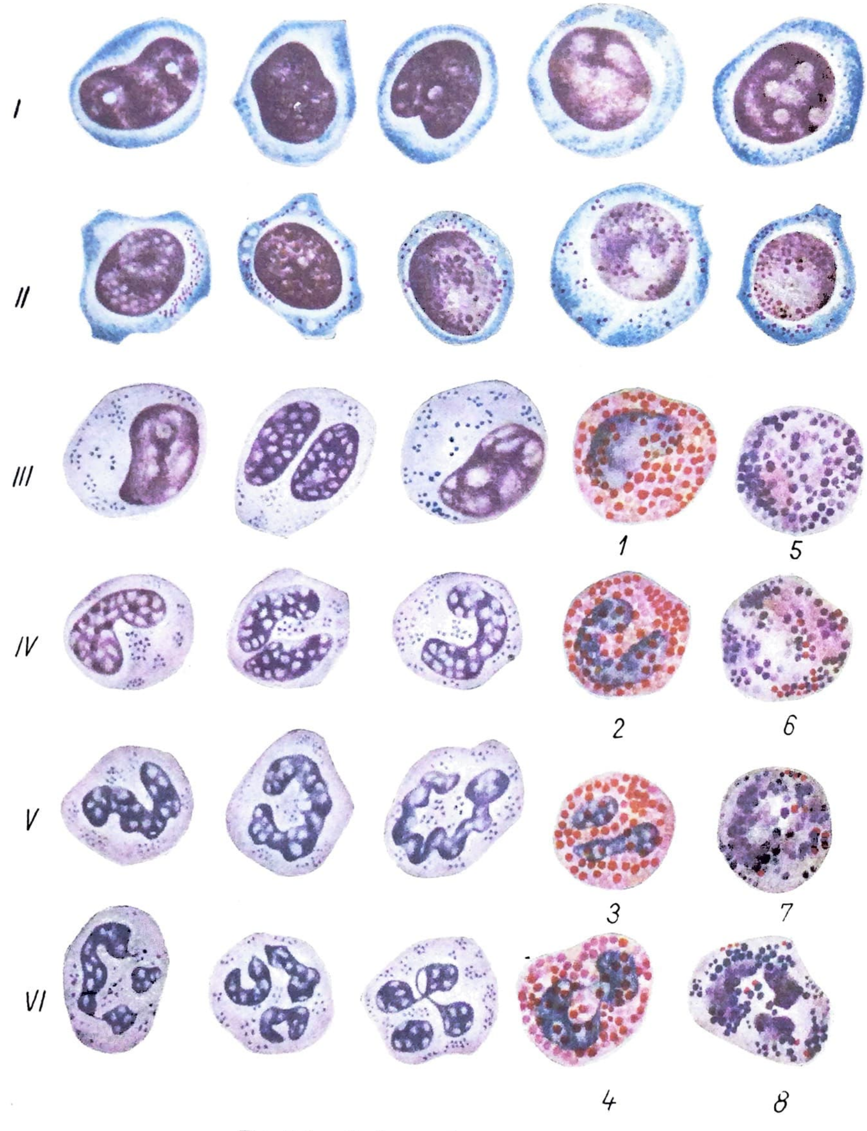

I
II
III
IV
V
VI
1
5
2
6
3
7
4
8

Fig. 156. — Seria granulocitară normală.

I — mieloblast; II — promielocit; III — mielocit; IV metamielocit; V — nesegmentat; VI — segmentat; III, IV, V, VI — neutrofile; 1, 2, 3, 4 — eozinofile; 5, 6, 7, 8 — bazofile.

6. Se lasă timp de 1 oră în soluţie de acid fucsin-sulfuros, într-un vas închis şi la întuneric.

7. Se trec apoi lamele într-o serie de 3 recipiente conţinînd soluţie de spălare, lăsîndu-se în fiecare soluţie cîte 2 minute (urmînd aceeaşi ordine pentru toate lamele).

8. Se spală 2—4 ore în apă distilată, reînnoind apa de 2—3 ori. Se usucă la aer.

Pentru control se recomandă colorarea unei lame fără hidroliză prealabilă : se începe colorarea de la punctul 4 al tehnicii şi se ţine la colorat (punctul 6) maximum 30 de minute. Restul urmează ca mai sus. Această lamă nu trebuie să se coloreze.

Rezultate. Se colorează în roşu-violet numai substanţa nucleară care conţine acid dezoxiribonucleic : cromatina nucleară, corpii Jolly, resturi nucleare, umbre nucleare. Restul elementelor celulare nu se colorează; locul unde a fost nucleolul se prezintă ca o vacuolă incoloră (la elementele tinere care au nucleol).

Timpul delicat al tehnicii este momentul hidrolizei; este recomandabil să se facă mai multe încercări, modificînd timpul cu 1—2 minute în plus sau în minus.

Unii autori recomandă fixarea lamei în alcool metilic 5 minute.

EVIDENŢIEREA ACIDULUI RIBONUCLEIC

Principiu. Coloraţie cu verbe de metil şi cu pironină, aceasta din urmă avînd afinitate specifică pentru acidul ribonucleic.

Reactivi:

— Alcool metilic

— Colorant :

Verde de metil cristalizat	0,15	g
Pironină	0,25	g
Alcool 96°	2,50	ml
Glicerină	2,5	ml
Apă fenolată 0,5 % pînă la	100	ml

Tehnica:

1. Fixarea frotiului în alcool absolut cîteva minute sau alcool metilic 5—10 minute.

2. Se acoperă preparatul cu soluţia colorantă 20—30 de minute. Spălare rapidă în apă. Diferenţiere rapidă şi deshidratare, cu alcool absolut.

Rezultate. Nucleoproteinele din cromatina nucleară se colorează în verde. Toate celelalte componente se colorează în diferite nuanţe de roşu. Citoplasma bogată în acid ribonucleic se colorează în roşu viu.

TEHNICA DE COLORAŢIE CU VERDE DE METIL — PIRONINĂ
(după Heilmeyer)

— *Soluţia I*

Verde de metil	1	g
Acid fenic	0,25	g
Apă distilată	100	ml

— *Soluţia II*

Pironină	1	g
Acid fenic	0,25	g
Apă distilată	100	ml

Tehnica. Lama se fixează la flacără. Se colorează cu un amestec de : 3 volume soluţie I şi 7 volume soluţie II, timp de 2—3 ore.

Rezultate. Citoplasma se colorează în roşu aprins, nucleul în verzui. Nucleolii în roşu.

TEHNICA CU SUDAN NEGRU B PENTRU LIPIDE

Reactivi :

— Soluţie de Sudan negru B : 0,3 g de Sudan negru B, bine mojarat, se dizolvă în 100 ml alcool absolut. Dizolvarea totală se obţine în timp de 1—2 zile, la temperatura laboratorului şi agitînd puternic din cînd în cînd.

— Soluţie tampon : 16 g de fenol cristalizat se dizolvă în 30 ml alcool absolut. Se amestecă această soluţie cu 100 ml apă conţinînd 0,3 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$.

— Înainte de întrebuinţare se amestecă 40 ml soluţie tampon cu 60 ml soluţie de Sudan negru B. Se filtrează. Amestecul trebuie să fie neutru sau uşor alcalin. Acest amestec nu poate fi păstrat decît cîteva săptămîni, acţiunea lui slăbind în timp. Adaosul de fenol face să apară mai bine granulaţiile.

— Formol 40%.

Tehnica :

1. Frotiul uscat se fixează cu vapori de formol, timp de 5—10 minute, într-o cutie Petri sau borcan închis conţinînd o mică cantitate de formol 40%.

2. Frotiurile se pun în soluţie de Sudan negru tamponată timp de 10 pînă la 60 de minute.

3. Spălare în alcool absolut sau alcool de 70% cîteva minute.

4. Spălare cu apă şi uscare.

5. Supracolorare cu soluţie Giemsa în apă neutră, timp de 40 de minute.

Culoarea albastră a eritrocitelor poate fi îndepărtată prin diferenţiere, timp de 30—60 de secunde, cu o soluţie apoasă de 0,2 g% de fosfat monopotasic.

Examenul cu imersie și spălarea cu xilol îndepărtează grăsimile neutre, clarificînd preparatul. lipidele intracelulare rămînînd intacte.

Rezultate pozitive : granulații maro-închis pînă la negru. Reacția intens pozitivă se întîlnește la granulocite neutrofile și eozinofile. Monocitele prezintă o reacție slab pozitivă. Limfocitele sînt lipsite de astfel de granulații (dau reacția negativă).

TEHNICA CU ACID PERIODIC – SCHIFF (PAS) PENTRU GLICOGEN

Principiu. Acidul periodic transformă grupările alcoolice ale hexozelor în grupări aldehidice care intră în reacție și se colorează cu leucofucsina (reactiv Schiff).

Materiale necesare :

1. Formol.

2. Soluție de acid periodic 1% în apă distilată – se poate folosi în decurs de o lună.

3. Reactiv Schiff (vezi și reacția Feulgen).

4. Soluție de spălare (apă sulfuroasă) (vezi și reacția Feulgen).

5. Verde-lumină sau hematoxilină soluție apoasă 1%.

Tehnica :

1. Fixare cu vapori de formol, timp de 5–10 minute, apoi spălare abundentă cu apă distilată.

2. Se tratează cu soluție de acid periodic timp de 7–10 minute; spălare cu apă distilată.

3. Se tratează cu reactiv Schiff, timp de 20–30 de minute, ferit de lumină.

4. Spălare în baia de reducere, timp de 2–3 minute, repetînd de 3–4 ori și schimbînd soluția după fiecare spălare.

5. Spălare cu apă de robinet curgătoare, timp de 10 minute, uscare.

6. Se poate colora fondul cu verde-lumină soluție 1% sau cu hematoxilină 1% soluție apoasă.

Prin reacția PAS nu se colorează numai glicogenul, ci și mucina, mucoproteinele, cerebrozidele, fibrina. Este necesar să se controleze reacția cu un martor al cărui glicogen a fost digerat cu salivă : lama fixată și uscată se acoperă cu salivă centrifugată, care se lasă timp de 60 de minute la temperatura camerei. Se spală, apoi colorarea urmează ca mai sus.

Rezultate : glicogenul apare sub formă de granulații roșii în citoplasmă. Celulele din seria granulocitară dau reacția pozitivă. La mieloblast și promielocit citoplasma dă o reacție de culoare roz-palid difuză. Granulațiile roșii apar de la mielocit și sînt mai intense pe măsură ce elementele sînt mai mature. Granulațiile eozinofilului nu se colorează, dar fondul citoplasmei este difuz pozitiv.

Limfocitele și monocitele prezintă reacție slab pozitivă cu granulații fine și rare. Trombocitele și megacariocitele prezintă mai intens reacția pozitivă.

Limfoblastul din leucoza acută dă o reacție PAS intens pozitivă, cu granulații numeroase în citoplasmă și poate fi astfel diferențiat de mieloblast, care prezintă o citoplasmă roz-difuză palid fără granulații.

II. STUDIUL MORFOLOGIC AL SERIEI LEUCOCITARE

SERIA GRANULOCITARĂ NORMALĂ

La individul adult normal, celulele de origine a seriei granulocitare se găsesc localizate în măduva hematopoetică a oaselor, ca și celulele seriei eritrocitare.

Celulele acestei serii sînt caracterizate prin apariția, în citoplasma lor, de granulații, la început azurofile nediferențiate și pe măsură ce se produce maturația, diferențiate, fie în granulații neutrofile, fie în eozinofile, fie în bazofile. De aici și numele de serie granulocitară.

O caracteristică importantă a acestor granulocite, indiferent de caracterele granulațiilor, este prezența în celule a unor fermenți oxidanți (oxidaze și peroxidaze), caracter care diferențiază celulele tinere ale acestei serii de celulele tinere ale seriei limfocitare.

MORFOLOGIA SERIEI GRANULOCITARE NORMALE

Mieloblastul este celula cap de serie. Diametrele sale sînt de 15–20 μ, forma rotundă sau, mai adesea, neregulat rotundă sau ovalară. Nucleul este mare, oval, cu structură cromatiniană fină, hipocromă, cu mai mulți nucleoli (pînă la 5–6).

Citoplasma este bazofilă, de nuanță albastru-deschis, mai intens colorată la marginea celulei; la colorația panoptică obișnuită citoplasma nu prezintă granulații, însă la celulele mai mature se întîlnesc deseori cîteva granulații azurofile, care reprezintă dovada trecerii spre promielocit. Cu cît celula este mai evoluată, cu atît granulațiile devin mai mari și nucleul se micșorează, iar nucleolii dispar progresiv. Astfel se ajunge la promielocit, fie direct prin diferenţiere şi maturaţie, fie prin diviziunea celulei. Reacţia peroxidazelor este în general negativă la mieloblast, dar există şi mieloblaşti care sînt peroxidazo-pozitivi.

Promielocitul derivă din mieloblast. Este o celulă mare, de 20—25 μ diametru (cea mai mare celulă din seria granulocitară), de formă rotundă sau ovalară.

Nucleul nu are nucleoli, este ovalar, prezentînd deseori o mică concavitate. Se pot întîlni şi promielocite cu nucleoli încă bine vizibili. Cromatina nucleară începe să se condenseze din loc în loc, fără să apară însă grămezi compacte. Se pot distinge unele zone rotunde mai palide, care reprezintă poziţia foştilor nucleoli.

Citoplasma prezintă granulaţii azurofile, care apar la început ca granule rare, ce se răspîndesc apoi şi cresc în dimensiuni. Aceste granulaţii azurofile nediferenţiate se mai numesc şi progranulaţii. Citoplasma este la început bazofilă, dar la un stadiu mai avansat se observă o zonă juxtanucleară mai clară la nivelul concavităţii nucleului, zonă ce şi-a pierdut bazofilia, luînd o coloraţie roz palid. Această zonă reprezintă arhoplasma; granulaţiile nu pătrund în această zonă, ci se opresc la periferia ei.

Granulaţiile azurofile (progranulaţiile) iau diferite aspecte, atît ca formă, cît şi ca culoare: punctiforme, bastonaşe, virgule, roşii-închise sau roşu-aprins.

Pe măsură ce promielocitul se maturează, citoplasma trece de la bazofilie spre o acidofilie uşoară şi începe diferenţierea granulaţiilor, întîi în jurul arhoplasmei. În acest stadiu se pot întîlni promielocite cu progranulaţii şi cu granulaţii diferenţiate, care reprezintă formele de trecere spre mielocit, şi cu fondul citoplasmei bazofil la periferie şi acidofil la centru.

Diferenţierea progranulaţiilor nediferenţiate se poate face spre 3 feluri de granulaţii specifice sau diferenţiate, care caracterizează granulocitul adult. Astfel, din stadiul de promielocit se poate preciza direcţia în care evoluează celula: neutrofil, eozinofil sau bazofil.

Granulaţiile neutrofile sînt granulaţii fine, rotunde, cu dimensiuni de 0,2—0,4 μ, foarte numeroase, de culoare brună mai mult sau mai puţin închisă. Par să derive din granulaţiile azurofile. Din punct de vedere citochimic granulaţiile neutrofile conţin un ester al acidului hialuronic (se distrug sub acţiunea hialuronidazei). Granulaţiile neutrofile conţin de asemenea o cantitate importantă de glicogen, care creşte paralel cu cel hepatic şi muscular după injecţii de hormon corticotrop.

Granulaţiile eozinofile mature sînt de culoare portocalie, ca icrele de Manciuria, de dimensiuni mai mari, atingînd deseori 1 μ. Aceste granulaţii derivă din progranulaţii, care evoluează umflîndu-se şi rotunjindu-se. Granulaţiile eozinofile trec în cursul evoluţiei lor prin mai multe aspecte tinctoriale: cînd sînt tinere sînt albastre, apoi devin violacee, violaceu-albastre, în cele din urmă devenind portocalii. Granulaţiile eozinofile sînt bogate în histone; după unii autori, conţin histamină sau acetilcolină; sînt bogate în lipide (coloraţie cu acid osmic), cu pH foarte alcalin (pH = 11).

Granulaţiile bazofile sînt în realitate granulaţii metacromatice: ele se colorează cu albastrul de metilen sau de toluidină, nu în albastru, ci în violet închis spre purpuriu. Derivă din granulaţiile azurofile, care înainte de a deveni metacromatice trec printr-un stadiu de bazofilie veritabilă. Sînt mari, de formă neregulată, inegale şi ating deseori 2 μ diametru.

Granulaţiile granulocitului bazofil sînt solubile în apă, spre deosebire de granulaţiile bazofilului tisular (mastocitul), care sînt insolubile în apă.

Mielocitul, cu dimensiuni cuprinse între 12 şi 18 μ, este o celulă cu nucleul rotund sau ovalar şi cu citoplasmă care conţine aproape numai granulaţii diferenţiate. Nucleul este mai mic şi mai închis la culoare decît al promielocitului, prezintă grămezi de cromatină nete, structura fiind grosolană; nucleolii lipsesc.

Citoplasma este în întregime virată spre acidofilie; fondul ei, văzut printre granulaţii, este roz palid, fără nici o urmă de bazofilie.

Mielocitul neutrofil prezintă granulaţiile caracteristice neutrofile, brune, fine şi foarte numeroase, pe un fond de citoplasmă roz palid.

Mielocitul eozinofil prezintă granulaţii eozinofile numeroase, lipite unele de altele, acoperind toată citoplasma.

Mielocitul bazofil conţine granulaţii de talie mare, neregulate ca formă şi dimensiuni, mai puţin numeroase.

Metamielocitul. Cu cît maturaţia nucleului progresează, cu atît grămezile de cromatină devin mai grosolane, mai dense şi mai bine delimitate. În acelaşi timp nucleul devine reniform, cu convexitatea tangentă la suprafaţa celulei.

Citoplasma prezintă granulații diferențiate în cele 3 direcții : neutrofile, eozinofile și bazofile, cu caracteristicile descrise mai sus.

Granulocitul nesegmentat. În cursul maturației, nucleul reniform al metamielocitului se subțiază și se alungește, luînd forma de potcoavă. Structura nucleului devine mai grosolană : cromatina este foarte densă, formată din mase compacte foarte închise la culoare, despărțite de benzi înguste și clare de oxicromatină, aspect care a fost denumit tigrat.

Citoplasma este acidofilă și conține granulații diferențiate : neutrofile, eozinofile sau bazofile.

Prin strangularea nucleului, granulocitul nesegmentat, cu nucleul în potcoavă sau în baston îndoit, devine segmentat cu 2, 3, 4, 5 segmente de nuclei. Se consideră segmentate celulele la care punțile de legătură între segmentele nucleare sînt mai subțiri cu 1/3 decît grosimea segmentelor.

Granulocitul nesegmentat este prima celulă din serie care poate fi găsită în mod normal în sîngele periferic, în proporție de 1—4%.

Granulocitul segmentat. Aceste celule, denumite impropriu polinucleare, au nucleul polisegmentat. Ca dimensiuni variază între 12 și 15 μ. Nucleul caracteristic prezintă structura descrisă la granulocitul nesegmentat. Cu cît celula este mai matură, cu atît are mai multe segmente. În mod normal, putem găsi pînă la 5 segmente ; în stări patologice se pot găsi un număr mai mare, ca de exemplu în anemia megaloblastică Biermer.

Granulocitul segmentat neutrofil are citoplasma acidofilă, roz palid, cu granulații neutrofile ; nucleul are două sau mai multe segmente.

Granulocitul segmentat eozinofil are citoplasma plină de granulațiile caracteristice portocalii. Este important de remarcat că nucleul granulocitului eozinofil prezintă numai 2 segmente (nucleu în bisac) și mult mai rar 3 segmente.

Granulocitul segmentat bazofil se recunoaște prin prezența granulațiilor caracteristice, care acoperă aproape toată citoplasma, multe întîlnindu-se suprapuse peste nucleu. Nucleul este segmentat, deseori neregulat și frecvent are formă de trifoi. În general, bazofilele sînt ceva mai mici decît neutrofilele și eozinofilele.

În mod normal, mieloblastul, promielocitul, mielocitul și metamielocitul se găsesc numai în măduva hematopoetică.

În sîngele periferic se întîlnesc granulocitele segmentate și un mic număr de granulocite nesegmentate, care nu depășesc 4% din totalul granulocitelor din periferie.

Formula Arneth

Arneth, în 1904, a clasificat granulocitele după numărul de segmente nucleare. Prima lui clasificare fiind prea greoaie, a fost simplificată mai tîrziu și azi se descriu în formula Arneth 5 clase. Această clasificare reprezintă vîrsta celulelor : cu cît un granulocit este mai evoluat, mai matur, cu atît numărul de segmente nucleare este mai mare, și invers.

Cele 5 clase sînt caracterizate prin :

1. Nucleu ușor incurbat.

2. Nucleu cu 2 lobi legați printr-un filament de cromatină.

3. Nuclei cu 3 lobi.

4. Nuclei cu 4 lobi.

5. Nuclei cu 5 lobi sau mai mult decît 5.

Dacă în sînge predomină elementele tinere cu nucleul puțin evoluat, se vorbește de o deviere la stînga. Dacă predomină seriile evoluate, cu nucleul cu mai multe segmente, se vorbește de o deviere la dreapta (fig. 157).

Indicele de deviere nuclear Schilling

Schilling a propus simplificarea formulei Arneth, distingînd 4 clase :

1. Mielocitul.

2. Metamielocitul.

3. Granulocitul nesegmentat.

4. Granulocitul segmentat, indiferent de numărul de lobi.

Indicele nuclear este suma elementelor din primele trei clase raportată la elementele din clasa a patra :

$$\text{Indicele nuclear} = \frac{\text{Numărul de elemente clasele } 1+2+3}{\text{Numărul de elemente clasa } 4}$$

$$\text{În mod normal indicele este} = \frac{4}{64} = \frac{1}{16}$$

Indicele crește în stările de excitare medulară : infecții.

FIZIOLOGIA CELULELOR SERIEI GRANULOCITARE

În mod normal, numărul de granulocite la adult variază în următoarele limite :

— granulocite neutrofile nesegmentate	1— 4%
— granulocite neutrofile segmentate	50—60%
— granulocite eozinofile	1— 4%
— granulocite bazofile	0,5—1%

Valorile absolute sînt redate în capitolul despre hemogramă, ca și variațiile fiziologice și patologice.

Citodiabaza seriei granulocitare se face ușor pentru elementele mature, care trec în sînge datorită faptului că prezintă o mobilitate activă : diapedeza.

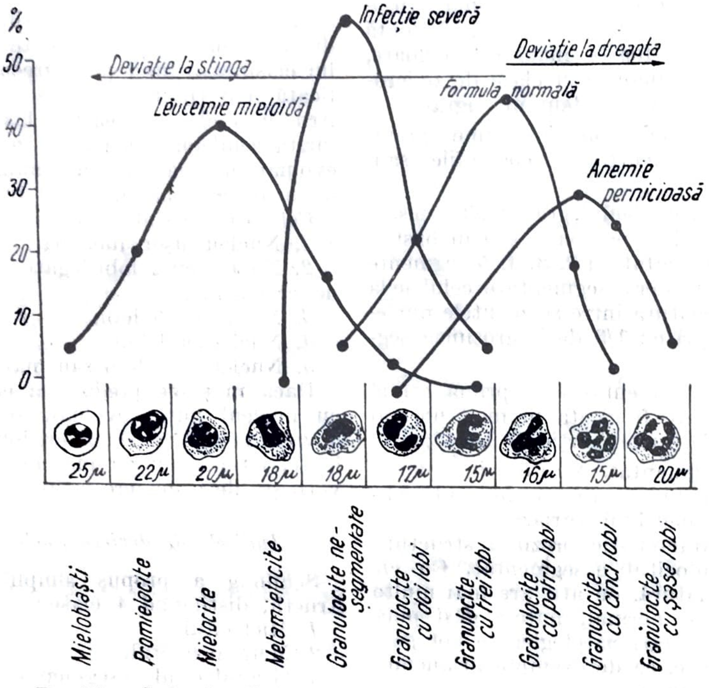


Fig. 157. — Curba Arneth în cazuri normale și patologice (după Bessis).

Mișcările amiboide, pseudopodice, caracterizează granulocitul matur ; celulele tinere, ca mieloblastul, promielocitul, mielocitul tînăr sînt lipsite de această proprietate. Studiile făcute cu microscopul în contrast de fază arată că granulocitele sînt sferice în sîngele circulant, dar se deformează cînd întîlnesc un suport solid, pe care se pot fixa. Atît citoplasma, cît și nucleul prezintă o mare plasticitate. Granulocitele pot înainta cu mișcări active, cu o viteză de 19 pînă la 36 μ/min.

Granulocitele prezintă proprietatea de a *fagocita* și de a digera microorganisme și particule străine. De asemenea pot fagocita, în anumite condiții, alte celule (eritrofagocitoză, leucofagocitoză). Datorită proprietății de diapedeză și unui chimiotactism deosebit, granulocitele pot migra în țesuturi, pentru a se dirija spre bacteriile patogene.

Fermenții. S-a putut pune în evidență în granulocite prezența a numeroși fermenți : fermenți proteolitici, lipaze, amilaze, nucleotidaze, fosfataze, catalaze etc.

Prezența *oxidazelor* și *peroxidazelor* reprezintă un caracter important pentru seria granulocitară, servind la diferențierea — altfel imposibilă în unele împrejurări — de seria limfocitară. Peroxidazele și oxidazele sînt prezente începînd de la promielocit pînă la granulocitul adult, mieloblastul prezentînd acest caracter în mod inconstant.

Granulocitele eozinofile posedă de asemenea proprietatea de a fagocita, deși într-un grad mai mic decît neutrofilele. Eozinofilele sînt sporite în stările de alergie. Eozinofilele conțin în granulații o mare cantitate de histamină sau substanțe înrudite.

Funcțiile granulocitelor bazofile sînt puțin cunoscute. Rolul lor în elaborarea de heparină este dubios, acest rol fiind legat de bazofilul tisular (mastocit).

PATOLOGIA CELULELOR SERIEI GRANULOCITARE

Modificarea numărului de granulocite. Numărul de granulocite se consideră crescut (granulocitoză) cînd depășește 9 000/mm³, și scăzut (granulopenie) cînd este sub 3 000/mm³.

Neutrofilie se numește creșterea numărului de granulocite neutrofile. Se întîlnește în infecții acute, mai ales cu coci, în intoxicații endogene, ca uremia, acidoza diabetică, eclampsia, guta, sau în intoxicații exogene cu săruri de mercur, digitală etc.

Neutrofilia este constantă după o hemoragie acută, frecventă după intervenții operatorii, în neoplasme cu evoluție rapidă, în infarctul de miocard, în stări hemolitice acute, ca accidentele posttransfuzionale.

Neutrofilia este puternică în timpul travaliului și în primele 2—3 zile de lăuzie.

Leucemia mieloidă cronică este caracterizată prin creșterea neutrofilelor și deviere puternică spre stînga.

În general, granulocitoza neutrofilă, constatată izolat în cursul unei stări febrile, este o indicație despre un eventual focar supurativ sau o stare septicemică.

În unele stări infecțioase grave, fără o leucocitoză crescută, este important să se cerceteze formula Arneth (dacă este deviată la stînga) sau indicele nuclear (dacă este crescut), care dau indicații prețioase.

De asemenea, în infecțiile de focar (granulom dentar, amigdalită cronică) se poate constata o deviere la stînga, cu creșterea granulocitelor neutrofile nesegmentate.

Cercetarea cifrei absolute a neutrofilelor, adică numărul lor pe mm³, este importantă.

Neutropenie. Cauzele care pot duce la o neutropenie sînt analizate în capitolul „Pancitopenii".

Neutropenia se întîlnește în unele boli infecțioase, ca febrele tifoidă și paratifoide, bruceloză, în viroze, ca gripa, rujeola, rubeola, în boli prin protozoare: paludism, kala-azar, febră recurentă.

Eozinofilie. O eozinofilie sub 300 elemente/mm³ nu prezintă nici o semnificație.

Eozinofilia se întîlnește în diverse afecțiuni:

— stări alergice, dermatoze, parazitoze;

— sindromul Loeffler (pneumopatie cu eozinofile);

— hemopatii: leucemia mieloidă cronică, leucemia cu eozinofile, granulomul cu eozinofile, în eritremie, anemie Biermer;

— tumorile organelor hematopoetice: boala Hodgkin.

Eozinopenia se întîlnește în faza de început al unor agresiuni, ca boli infecțioase, intoxicații etc., sau după administrare de hormoni corticoizi sau ACTH (proba Thorn).

Trebuie să se facă deosebire între o eozinopenie adevărată de o eozinopenie relativă și această diferențiere necesită determinarea numărului absolut de eozinofile/mm³.

Bazofilia. Granulocitele bazofile cresc în leucemiile mieloide cronice. Asocierea de bazofilie cu eozinofilie este un semn frecvent întîlnit și precoce în leucemia mieloidă. După radioterapie numărul de leucocite scade, dar numărul de bazofile se menține crescut. Se observă o creștere a bazofilelor în unele ciroze hepatice, în ictere hemolitice, în cancere.

Trecerea anormală a celulelor imature în sînge (*reacții leucemoide*). În afară de leucoza mieloidă cronică se poate întîlni în sîngele periferic un număr crescut de leucocite, care poate să atingă sau să depășească 100 000 elemente/mm³, cu apariția de elemente tinere, pînă la promielocit și mieloblast. Astfel de stări leucemoide se întîlnesc în anemiile pronunțate și acute, indiferent de cauză, dar îndeosebi în anemiile acute însoțite de hemoliză, în unele infecții sau în intoxicații, în neoplasme.

Reacțiile leucemoide se observă în:

— infecții, ca pneumonia, meningita cu meningococ, difteria, tuberculoza acută etc.;

— intoxicații cu săruri de mercur, eclampsie, arsuri grave, anemii hemolitice acute cu stări de uremie acută (accidente posttransfuzionale), în hemoragii severe;

— metastazele osoase, cînd apare o anemie eritroblastică și cu granulocite imature.

Pentru diagnosticul diferențial cu leucoza mieloidă cronică a se vedea capitolul despre „Leucoze".

Importanța cercetării variațiilor granulocitelor în cursul bolilor infecțioase. Creșterea sau scăderea excesivă a granulocitelor este de prognostic defavorabil.

Prezența formelor cu granulații toxice sau a formelor degenerative este de prognostic defavorabil.

De asemenea, prezența formelor tinere în număr mare, mai ales cînd depășesc numeric pe cele mature, are o semnificație defavorabilă.

Absenţa eozinofilelor are aceeaşi semnificaţie.

Evoluţia favorabilă, vindecarea, se anunţă prin diminuarea formelor imature şi a celulelor cu granulaţii toxice, însoţită de reapariţia sau creşterea eozinofilelor, apoi a monocitelor şi în cele din urmă a limfocitelor.

PATOLOGIA GRANULOCITELOR

Variaţii de talie. În mod normal, granulocitele variază ca talie între 12 şi 15 μ. Există deci o anizocitoză fiziologică puţin pronunţată. În condiţii patologice această anizocitoză devine pronunţată.

Granulocite gigante sînt granulocite de talie mare, cu dimensiuni care depăşesc pe cele normale cu 4—5 μ. Cînd granulocitul gigant este segmentat şi prezintă mai mulţi lobi este denumit macropolicit. Cînd este vorba de granulocite nemature, se vorbeşte de metamielocit gigant sau nesegmentat gigant.

Granulocitele gigante se întîlnesc mai ales în anemiile megaloblastice. Astfel, dacă în sîngele periferic se întîlnesc macropolicite, în măduvă se întîlnesc gigantocite.

Pleiocariocite se numesc granulocitele adulte care prezintă mai mult de 5 lobi nucleari: 6—8—10 şi mai mulţi lobi nucleari. Se întîlnesc în anemiile megaloblastice. Se admite că aceste elemente hipersegmentate provin direct din elemente foarte tinere, ca promielocitul care se maturează amitotic, prin modificarea structurii, fără să treacă prin stadiile succesive de mielocit, metamielocit etc.

Carioschize se numesc mici pediculi ai nucleului, care atunci cînd sînt foarte numeroşi indică, în general, un proces grav toxiinfecţios: cancer generalizat, tuberculoză preterminală etc. Recent s-a demonstrat că astfel de formaţiuni apar la cobai după iradieri, şi pot fi considerate ca un semn fidel al efectului radiaţiilor.

În unele cazuri citoplasma granulocitelor adulte devine roz-cenuşie şi acest aspect coincide deseori şi cu diminuarea sau chiar dispariţia granulaţiilor; aceste granulocite se numesc *hipogranulare* şi *hialine*. Se întîlnesc în cazuri de leucoză mieloidă, în agranulocitoză, în infecţii grave. Această dispariţie a granulaţiilor nu are semnificaţie patologică dacă este izolată numai la cîteva elemente.

Modificări citoplasmatice. Citoplasma granulocitelor poate prezenta zone bazofile, în asincronism de maturaţie cu restul citoplasmei. Cînd astfel de zone bazofile sînt limitate şi izolate în citoplasma de aspect matur şi normal, sînt denumite corpii Döhle.

Granulaţiile toxice se colorează cu soluţia Giemsa diluată în tampon cu pH = 5,4 (coloraţia Momsen), soluţie cu care granulaţiile neutrofile nu se colorează. Se întîlnesc în infecţii ca: tuberculoza, pneumonia, tifosul exantematic, ca şi în cazul tumorilor maligne, în ciroză, coma diabetică.

ANOMALII EREDITARE ALE GRANULOCITELOR

Anomalii calitative

Anomaliile nucleare privesc mai ales gradul de segmentare a nucleilor.

1. *Anomalia Pelger-Huet* este o anomalie ereditară caracterizată prin absenţa de segmentare a nucleului granulocitelor; aproape toţi nucleii sînt nesegmentaţi sau prezintă cel mult 2 lobi. Structura cromatiniană este mai grosolană decît la normal. Astfel de nesegmentate se mai numesc şi pseudometamielocite. Indivizii purtători de o astfel de anomalie a granulocitelor nu prezintă nimic patologic, clinic. Anomalia se întîlneşte şi la eozinofile, care rămîn cu nucleul în potcoavă sau chiar rotund.

2. *Hipersegmentarea constituţională a nucleilor* şi

3. *Segmentarea constituţională a nucleilor granulocitelor eozinofile* reprezintă alte tipuri de anomalii nucleare ale granulocitelor.

Anomalii citoplasmatice ale granulocitelor sînt următoarele:

1. *Anomalia Alder* este o anomalie constituţională foarte rară a granulaţiilor; toate tipurile de granulocite, de la promielocit la granulocitul adult, prezintă numeroase granulaţii azurofile mari, care ascund nucleul celulelor. Această anomalie afectează, în afară de granulocitele de toate tipurile, şi parte din limfocite şi monocite. Bazofilele şi eozinofilele apar colorate în violet închis spre negru. Monocitele şi limfocitele prezintă granulaţii azurofile mai mari şi mai numeroase decît în mod obişnuit. Această anomalie se însoţeşte uneori de deformări osoase (boala Hurler, gargoilism).

Clinic nu se constată nici o tulburare.

2. *Anomalia May-Heggelin* se caracterizează prin prezenţa de corpi Döhle la toate speciile de leucocite, dar mai ales la granulocite neutrofile şi eozinofile. Anomalia pare să meargă paralel cu existenţa de trombocite gigante.

3. *Anomalia Chediak* a fost observată de acest autor la 4 copii dintr-o familie de 14 copii.

Toate speciile de leucocite prezintă granulații azurofile enorme, atingînd 2–5 μ, conținute într-o vacuolă. Nucleii prezintă malformații și picnoză. Citoplasma conține corpi Döhle.

Anomalii cantitative

Dintre acestea fac parte:
– neutropenia constituțională și
– eozinofilia familială.

SERIA LIMFOCITARĂ NORMALĂ

Celulele de origine a seriei limfocitare se găsesc în foliculii limfatici ai ganglionilor limfatici, în foliculii limfatici diseminați în organism, mai ales în splină, amigdale, timus, intestin etc. Există rari foliculi limfatici și în măduva oaselor.

În mod normal, limfoblastul și prolimfocitul nu trec în sîngele periferic.

MORFOLOGIA SERIEI LIMFOCITARE NORMALE

Limfoblastul este o celulă cu talie de 12–15μ, cu nucleul dispus central de formă rotundă, cu cromatina ca o rețea fină; raportul nucleo-citoplasmatic este mare. Nucleul său conține cel mai adesea un singur nucleol, bine delimitat de un cerc de condensare cromatiniană, dar colorat palid, ceea ce este caracteristic pentru limfoblast.

Citoplasma limfoblastului este albastru deschis, lipsită de granulații.

Prolimfocitul constituie treapta ulterioară de maturație în seria limfocitară. Celula are dimensiuni de 9–12 μ. Nucleul are structura cromatiniană mai densă decît a limfoblastului, nucleolul este mai puțin vizibil sau apare numai ca o urmă.

Limfocitele au dimensiuni și caracteristici morfologice variate în funcție de gradul lor de maturitate.

Limfocitul mare măsoară 10–16 μ. Nucleul mare, înconjurat în toate părțile de citoplasmă, este rotund sau ovalar. Este mai mic decît nucleul limfoblastului, mult mai închis la culoare și prezintă grămezi de cromatină de aspect compact, despărțite de zone mai clare, dar fără o demarcație netă. Nu prezintă nucleol.

Citoplasma limfocitului mare, bine delimitată și întinsă, este bazofilă; deseori are o colorație foarte deschisă, albastru ca cerul, cu o bandă subțire mai intens albastră la periferie.

Citoplasma conține deseori, dar nu totdeauna, cîteva granulații azurofile foarte închise la culoare, puține la număr, nedepășind niciodată zece, uneori înconjurate fiecare de un halou mai clar. Dimensiunile acestor granulații pot varia între 0,3 și 0,6 μ. Granulațiile azurofile se întîlnesc mai frecvent în celulele sîngelui circulant decît în puncția ganglionară, și anume la aproximativ 20–40% din elemente. Colorațiile speciale, cu fucsină, pun în evidență granulații sau bastonașe fucsinofile, considerate specifice pentru limfocit (granulații Altmann-Schridde).

Limfocitul mic este o celulă de talie mică, cît un eritrocit sau puțin mai mare: 6,2–9 μ.

Nucleul este ușor ovalar, uneori puțin curbat, cu cromatină foarte densă, violet închis, compusă din grămezi cromatiniene imperfect delimitate.

Nucleul ocupă nouă-zecimi sau mai mult din suprafața celulei, astfel că citoplasma, intens bazofilă, este foarte redusă, uneori greu vizibilă, și deseori vizibilă numai pe o parte din circumferința nucleului. Uneori nucleul este picnotic și citoplasma invizibilă, sau redusă la o dungă extrem de subțire.

Nu se știe precis dacă limfocitul mic rezultă din limfocitul mare.

În mod normal există aproximativ 10% limfocite mari și 90% mici. La copil numărul limfocitelor mari este mai ridicat, raportul putînd fi inversat. În mod normal se găsește deseori în nucleul acestor celule o zonă nucleară mai clară, care reprezintă vestigiul nucleolului. Astfel de imagini se întîlnesc mai ales la copil sau în cazurile cînd numărul de limfocite mari este crescut, fără să aibă însă nici o semnificație patologică.

FIZIOLOGIA CELULELOR SERIEI LIMFOCITARE

Limfocitele au o durată de viață foarte scurtă, aproximativ 24 de ore. Ca toate leucocitele, limfocitele transfuzate părăsesc circulația și se opresc la nivelul plămînilor. Numeroase cercetări susțin rolul important al limfocitelor în producerea de anticorpi.

Seria limfocitară nu conține oxidaze și peroxidaze.

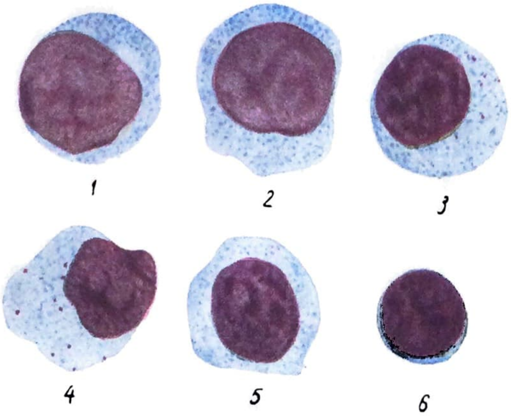


Fig. 158 — Seria limfocitară (*1—6*).

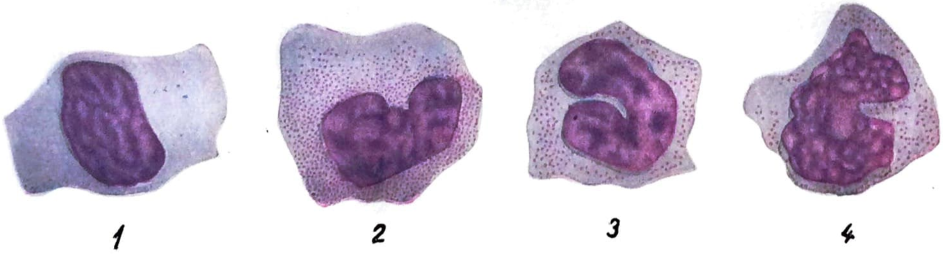


Fig. 159 — Monocite în diferite stadii de evoluţie (*1—4*) (după Heilmeyer).

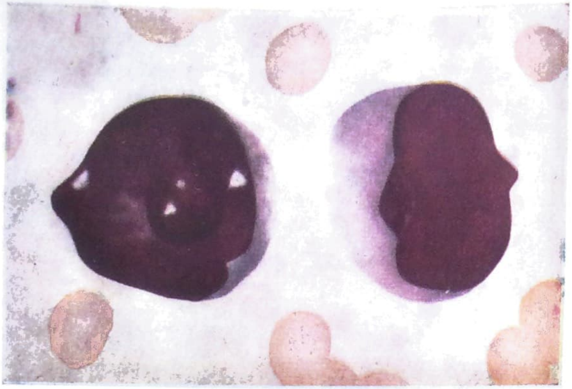
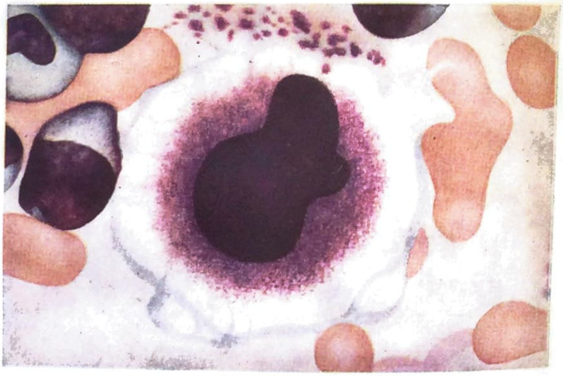
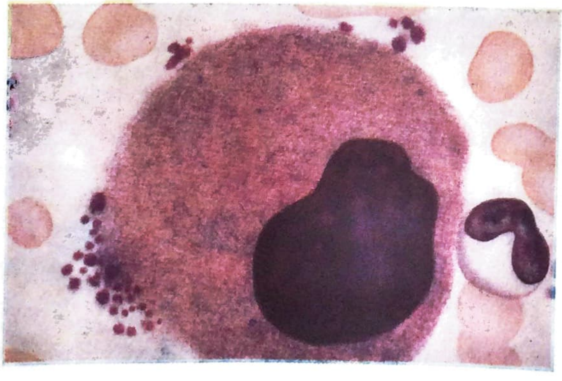


Fig. 160. — Seria trombocitară.
A — megacarioblast și promegacariocit.

B — megacariocit granulat netrombocitogen.





C — megacariocit granulat trombocitogen.

Limfocitele conțin nucleaze, amilază, lipază, lizozim, adenosimază, catepsină.

Limfocitele prezintă mișcări active; aceste celule înaintează tot așa de rapid ca și granulocitele, dar nu au proprietatea de a fagocita.

PATOLOGIA CELULELOR SERIEI LIMFOCITARE

Modificarea numărului de limfocite

Limfocitele sînt crescute în următoarele împrejurări:

— Limfocitoza fiziologică a copilului
— Reacții leucemoide limfocitare (copii)
— Limfocitoza infecțioasă acută (boala Carl Smith)
— Tusea convulsivă
— Mononucleoza infecțioasă (limfo-monocite)
— Toxoplasmoză
— Agranulocitoză (creștere relativă)
— Infiltrație limfocitară medulară benignă la sugari și copii cu anemie feriprivă
— Leucoză limfocitară.

Limfocitoza fiziologică a copilului este o limfocitoză absolută, care diminuează treptat, ajungînd în adolescență la cifrele de la adult.

Limfocitoză se găsește și în infecții, ca: tuberculoza la începutul evoluției, rujeola, scarlatina.

Tusea convulsivă este caracterizată printr-o creștere mare și aproape constantă a limfocitelor. În boala Carl Smith, sau limfocitoza acută infecțioasă, numărul lor crește foarte mult.

Leucoza limfoidă cronică și diagnosticul diferențial cu alte limfocitoze, reacțiile leucemoide limfocitare și metaplazia limfoidă vor fi prezentate în cadrul textului privitor la leucoza limfoidă cronică.

Pentru *noțiunea de limfo-monocit* a se vedea mononucleoza infecțioasă, iar pentru cea de paralimfoblast, leucoza acută.

Limfocitele de tip Rieder sînt limfocite, cu nucleul prezentînd o incizură adîncă sau chiar bilobat. O creștere accentuată a numărului acestor elemente denotă o reacție iritativă a sistemului limfatic, în limfocitoze ca cea din tusea convulsivă de exemplu.

Umbrele nucleare sau **umbrele Gumprecht** sînt formațiuni nucleare întinse, fără resturi de citoplasmă, care provin din limfocitele distruse, distrugere care are loc pe lamă în momentul întinderii frotiului. Umbrele nucleare denotă o friabilitate exagerată a elementelor, o stare patologică. Se întîlnesc în număr mare în leucoza limfatică: 20 — 50 de umbre la 100 de leucocite, semn foarte important în diagnosticul leucozei limfatice cronice, servind deseori pentru a diferenția o leucoză limfatică de o leucoză acută, cu elemente morfologic asemănătoare cu limfocitele (micromieloblaști).

În limfocitozele banale aceste umbre nu se găsesc sau sînt în număr redus.

În excitații ale sistemului reticulo-histiocitar se întîlnesc în sîngele periferic celule reticulare limfoide mici, care au aspectul limfocitului. Nucleolul acestor celule poate fi pus în evidență numai prin colorații vitale (G. A. Alekseev). Aceste celule au deseori formă alungită, la un pol al celulei sau la două capete diametral opuse. Se întîlnesc în unele reticuloze, în leucoza limfoidă.

SERIA MONOCITARĂ NORMALĂ

Originea monocitelor este în sistemul reticulohistiocitar din toate organele și țesuturile.

Astfel, monoblastul, care dă naștere monocitului circulant, ia naștere din celula reticulară, nu numai din organele hematopoetice, dar și din toate țesuturile; se întîlnește atît în amprentele de organe, ca plămîn, ficat, cît și în cele din țesutul subcutanat. Prin acest caracter difuz, monoblastul se opune celorlalte celule cap de serie, care sînt strict localizate în țesutul organelor hematopoetice.

MORFOLOGIA SERIEI MONOCITARE

Monoblastul. Termenul de monoblast este folosit pentru a denumi celula de origine a monocitelor care provin din histiocite, celule nediferențiate ale sistemului reticulo-histiocitar. În stare normală, este imposibil să se prevadă dacă un monoblast (sau histioblast) va evolua sau nu spre un monocit; termenul de monoblast își are sensul lui adevărat numai în monocitoze, cînd acest element se întîlnește în sîngele periferic.

Monoblastul este o celulă ovalară foarte mare, cu diametre de 25 — 30 μ. Nucleul ovalar, mare de 20 μ, posedă 1 — 2 nucleoli albăstrui sau incolori. Un caracter important al acestor celule este poziția nucleului: axul mare al acestuia este dispus perpendicular pe axul mare al celulei, contrar altor celule reticulare, al căror nucleu ovalar este dispus în sensul axului mare al celulei.

Promonocitul este un stadiu celular mai diferențiat, permițînd un diagnostic citologic. Promonocitele sînt celule mari, cu nucleul care începe să se incurbeze. Nucleolii sînt greu vizibili. Deseori nucleul este rectangular sau trapezoid, atingînd, pe o anumită porțiune, marginea citoplasmei; uneori împarte citoplasma în două, atingînd cele două margini diametral opuse (celulă-steag). Rețeaua cromatiniană este laxă, reticulară, cu striuri dirijate în direcția axului longitudinal al nucleului.

Citoplasma este bazofilă, abundentă, la colorația May-Grünwald-Giemsa observîndu-se granulații foarte fine azurofile, în număr redus. Cu cît celulele seriei monocitare sînt mai tinere, cu atît conțin mai puține granulații.

Promonocitul rămîne în mod normal în țesuturi. Dacă evoluează spre monocit, citoplasma se încarcă cu numeroase granulații azurofile, nucleul se desprinde de marginea citoplasmei și se incurbează, devenind o celulă matură, care trece în sînge.

Monocitul este forma matură a seriei, care se găsește în sîngele periferic în mod obișnuit. Este o celulă cu un nucleu foarte polimorf. Este cea mai mare celulă din sîngele periferic: 20 – 25μ.

Citoplasma are o culoare albastră-cenușie, palidă, tulbure, clasic comparată cu cerul înnourat de furtună; conține fine granulații azurofile, presărate ca o pulbere, mult mai fine decît progranulațiile promielocitului. Aceste granulații se dispun adesea mai mult central, lăsînd o bandă de citoplasmă slab bazofilă, negranulată pe marginea celulei.

Nucleul monocitului este caracteristic: în general mare, cu structura cea mai fină dintre toate elementele normale din sîngele periferic, nucleul este sărac în cromatină, palid, format dintr-o rețea laxă caracteristică. Nu prezintă nucleoli, nici mase de cromatină condensată.

Forma nucleului poate fi extrem de variată, forma ovală sau cea reniformă fiind cel mai des întîlnite în mod normal. Nucleul poate fi adînc incizat sau polilobat, simulînd nucleul de neutrofil nesegmentat sau chiar segmentat. Spre deosebire de granulocite însă, nucleul monocitului nu este niciodată complet incizat, adică lobat, iar citoplasma lui este ușor bazofilă, nu acidofilă, ca la metamielocit și la nesegmentat.

Originea reticulo-histiocitară a monocitului face ca și în mod normal să se găsească uneori monocite cu citoplasmă vacuolizată. Monocitele prezintă o reacție peroxidazică pozitivă foarte discretă.

FIZIOLOGIA CELULELOR SERIEI MONOCITARE

Funcțiile celulelor seriei monocitare sînt asemănătoare cu cele ale sistemului reticulo-histiocitar, descrise în capitolul respectiv.

PATOLOGIA CELULELOR SERIEI MONOCITARE

Patologia celulelor seriei monocitare este legată de patologia sistemului reticulo-histiocitar.

Variațiile numărului de monocite

Modificarea numărului de monocite survine în diferite afecțiuni. În mod normal se găsesc între 400 și 800 monocite/mm ^{3}. Peste 800 elemente/mm ^{3} se poate vorbi despre monocitoză.

Monocitoza este extrem de frecventă într-un mare număr de boli, îndeosebi în infecții și în bolile parazitare. Monocitoza traduce excitarea sistemului reticulo-histiocitar, constatată mai cu seamă în reticulozele proliferative acute sau cronice.

Printre reticulozele proliferative acute se pot enumera: febra tifoidă, tifosul exantematic, endocardita lentă (boala Osler), reumatismul articular acut, boli parazitare, ca malaria, kala-azar, tripanozomiaza etc. Monocitoza poate să apară în puseuri în cursul acestor afecțiuni și poate varia de la o zi la alta sau chiar în decurs de cîteva ore.

Un aspect deosebit al monocitelor se observă în mononucleoza infecțioasă în care se descriu formele denumite limfo-monocite (a se vedea: „Mononucleoza infecțioasă").

Reticulozele proliferative cronice se întîlnesc în cursul unor inflamații sau iritații prelungite ale sistemului reticulo-histiocitar, care reacționează prin proliferare, hipertrofie și hiperfagocitoză la început, iar apoi prin scleroză, fibroză, cicatrizare.

Survine în malaria cronică, în unele forme de kala-azar, în sifilis, în tuberculoza cronică, în sindromul Banti, în limfogranulomatoza benignă Besnier-Boeck-Schaumann.

Modificări patologice ale monocitelor

Modificări de talie. Chiar în stare normală monocitele prezintă o anizocitoză pronunțată. În anumite stări infecțioase, ca în boala Osler, se întîlnesc în sînge macromonocite, celule endoteliale al căror aspect amintește celula reticulară macrofagă, prezentînd fine granulații azurofile, vacuole, și particule incluse, fagocitate. Nucleul poate avea nucleol.

Modificări de culoare. Se pot întîlni variații în ceea ce privește mai ales numărul granulațiilor azurofile. În boala Niemann-Pick se semnalează existența în sîngele periferic a monocitelor vacuolizate.

Modificări de formă. Se întîlnesc celule cu nucleul polilobat cu numeroși lobi, în treflă etc. Astfel de alterări se pot întîlni în stări toxiinfecțioase grave. De asemenea, în reticuloza histio-monocitară apar celule monocitoide atipice, cu nucleul monstruos.

SERIA TROMBOCITARĂ NORMALĂ

În mod normal, organul trombocitoformator este măduva oaselor hematopoetică.

Megacariocitul este celula de origine a trombocitelor. Deși originea megacariocitului a ridicat multe discuții, azi se admite că această celulă derivă din hemocitoblast. Prin diviziuni multiple nucleare, neurmate de diviziunea citoplasmei (poliploidie), celula atinge dimensiuni enorme, care pot ajunge pînă la 200 și 300 μ.

Trombocitele iau naștere în citoplasma megacariocitului, prin diferențierea acestei citoplasme, la un anumit stadiu de maturație a celulei.

Argumentele care rezultă din patologie arată strînsa legătură între modificările megacariocitelor și cele ale trombocitelor.

În stări patologice se poate întîlni o metaplazie megacariocitară generalizată, mai ales în splină.

ASPECTUL MORFOLOGIC

Megacarioblastul este celula cap de serie. Este o celulă relativ mică față de stadiile mai evoluate ale acestei serii, cu diametrul de aproximativ 30 μ, de formă rotundă sau vag patrulateră, cu colțurile rotunjite.

Citoplasma este intens bazofilă, lipsită de granulații, foarte redusă, nucleul ocupînd aproape toată celula.

Nucleul trapezoid sau ovalar are o structură cromatiniană destul de grosolană pentru o celulă tînără.

Prezintă 2 — 3 nucleoli bazofili, de formă și mărime variabilă. Se pot întîlni megacarioblaști în mitoză pluripolară (poliploidie).

Megacariocitul bazofil sau **promegacariocitul** este un element mai evoluat, de formă rotundă sau ușor poligonală, cu diametrul atingînd în medie 40 μ.

Citoplasma este tot bazofilă, dar uneori în jurul nucleului se distinge o zonă incoloră, locul de apariție a granulațiilor din stadiul următor.

Nucleul, de obicei reniform, prezintă una sau două strangulări, care indică începerea împărțirii în mai mulți lobi. Poziția nucleului este excentrică. Cromatina nucleară este mai densă, rețeaua fiind presărată pe alocuri cu mici grămezi de bazicromatină. Nucleolii au dispărut.

Megacariocitul granulat netrombocitogen este o celulă de dimensiuni mari, cu diametru variind între 50 și 100 μ.

Citoplasma, cu fondul foarte slab bazofil, cuprinde nenumărate granulații fine azurofile. Din cauza acestor granulații culoarea citoplasmei apare violetă. Granulațiile apar în primul rînd în zona perinucleară, în care bazofilia citoplasmei a scăzut încă din stadiul precedent, și se răspîndesc apoi în toată celula. Uneori în acest stadiu rămîne o bandă subțire periferică de citoplasmă lipsită de granulații, care dispare în stadiul următor.

Nucleul megacariocitului granulat este situat excentric, mai rar central, prezentînd mai mulți lobi inegali ca mărime, ovalari sau piriformi. Lobii nucleului sînt rareori izolați, de obicei fiind legați între ei prin filamente de cromatină mai groase sau punți cromatiniene largi.

Structura cromatinei este densă, fără nucleoli.

Megacariocitul granulat trombocitogen este un element mai mare, cu diametrul de 80 — 120 μ. Structura și forma nucleului, ca și afinitatea tinctorială a citoplasmei și a granulațiilor sînt asemănătoare cu cele descrise la megacariocitul netrombocitogen.

Cînd megacariocitul este trombocitogen, citoplasma și granulațiile iau un aspect deosebit: granulațiile din citoplasma megacariocitului se aglomerează în grupuri mici, izolate între ele prin benzi de citoplasmă hialină, dînd un aspect apropiat cu cel întîlnit cînd există grupuri mari de trombocite aglutinate. În alte celule astfel de aglomerări ale granulaţiilor sînt limitate la un pol al citoplasmei, de la care se observă prelungiri ca nişte fragmente, care pleacă de pe suprafaţa citoplasmei şi au spre vîrful lor liber cîteva trombocite. Un astfel de aspect a fost denumit şnuruire, iar megacariocitele sînt denumite şnuruite. În acest stadiu nucleul devine picnotic.

Nuclei liberi de megacariocit. Prin îmbătrînire, megacariocitele încep să prezinte vacuole citoplasmatice, iar desenul cromatinian se şterge. Se întîlnesc deseori nuclei liberi de megacariocite fără citoplasmă, uneori cu cîteva grămezi de trombocite aglutinate în jurul lor.

Trombocitul. Rotunde sau ovalare, trombocitele au dimensiuni care variază între 2 şi 5 µ. În structura lor se disting două părţi :

— partea periferică, omogenă, aproape incoloră sau foarte slab bazofilă, denumită hialomer ;

— partea centrală, denumită cromomer (granulomer), conţine granulaţii dens dispuse, care provin din îngrămădirea granulaţiilor citoplasmatice megacariocitare. Ele sînt de culoare roşie-violacee.

Granulaţiile cromomerului sînt de obicei grupate în centrul celulei ; uneori însă apar răspîndite pe toată suprafaţa celulei sau dispuse în coroană în jurul unei vacuole, iar alteori foarte strînse în centrul celulei. Aceste granulaţii ale cromomerului sînt pur azurofile : reacţia Feulgen, verdele de metil nu le colorează, ceea ce dovedeşte absenţa de cromatină.

FIZIOLOGIA CELULELOR SERIEI TROMBOCITARE

Maturaţia totală a unui megacariocit durează aproximativ 4 zile. Durata de viaţă a trombocitului este de aproximativ 4 – 8 zile.

Rolul trombocitelor în hemostază va fi prezentat la capitolul referitor la „Studiul hemostazei".

Printre caracterele trombocitelor, aglutinabilitatea lor spontană şi adezivitatea prezintă interes practic şi trebuie cercetate în afecţiunile legate de patologia trombocitelor.

PATOLOGIA CELULELOR SERIEI TROMBOCITARE

Modificarea numărului de trombocite

Scăderea numărului de trombocite sau trombocitopenie şi creşterea lor, sau trombocitoza, sînt discutate în capitolul „Studiul hemostazei".

Modificări morfologice ale trombocitelor

(Pentru amănunte, a se consulta trombocitopeniile şi trombocitopatiile).

Macrotrombocite. Diametrul trombocitelor poate depăşi 5 µ, putînd să atingă 7, 10, 20 µ şi chiar mai mult. Astfel de trombocite gigante se pot întîlni în unele trombopenii extreme din leucoze.

Se pot întîlni trombocite bazofile, încărcate mai mult sau mai puţin cu granulaţii, ca şi microtrombocite.

Metaplazia megacariocitară

Se întîlneşte în special în splenomegalia mieloidă cronică a adultului, în leucoza mieloidă cronică.

Metaplazia megacariocitară poate fi însoţită, în unele cazuri, de prezenţa de megacariocite, de nuclei sau de lambouri de citoplasmă de megacariocite în sîngele periferic. Aceste posibilităţi se întîlnesc în splenomegalia cronică cu mieloscleroză.

Se descriu şi forme de leucoză cu megacariocite, foarte rare, caracterizate prin creşterea considerabilă a trombocitelor în sînge şi a megacariocitelor în măduvă, cu apariţia de forme tinere de megacariocite în sîngele periferic.

III. AFECŢIUNILE SERIEI LEUCOCITARE

LEUCOZA MIELOIDĂ CRONICĂ

Clinic se caracterizează prin debut insidios, febră în puseuri, splenomegalie pronunţată, uşoară hepatomegalie.

Este mai frecventă între 30 şi 50 de ani, se observă uneori la cei în vîrstă înaintată, este rară, dar nu excepţională, la copil.

Sîngele periferic. Pentru diagnosticul leucemiei mieloide cronice sîngele periferic este deseori mai explicit decît măduva.

Seria leucocitară poate arăta :

— în forma leucemică : sute de mii de leucocite/mm ^{3} ;

— în forma subleucemică : sub 20 000 sau sub 40 000 leucocite/mm ^{3}.

—Formele celulare din sîngele periferic realizează o deviere la stînga a formulei Arneth ; se găsesc în număr mare mielocite şi metamielocite ; promielocite şi mieloblaşti, în număr mic.

— Există o sporire a eozinofilelor şi bazofilelor, ceea ce reprezintă un semn important şi precoce.

— În formele înaintate sau în puseuri acute creşte numărul de mieloblaşti şi promielocite, apare trombopenia şi se instalează anemia. Cresc bazofilele.

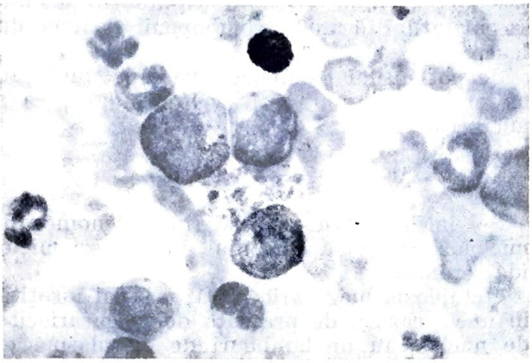


Fig. 161. — Leucoză mieloidă cronică. Sînge periferic.

— Se întîlnesc modificări calitative ale diferitelor leucocite, ca anizocitoză, asincronism de maturaţie citoplasmatic şi nuclear, segmentare insuficientă a nucleului. Aceste modificări se pot însă găsi, dar mai puţin pronunţate, şi în stările leucemoide. O importanţă deosebită o are determinarea fosfatazei alcaline pentru diagnosticul leucozei mieloide. Activitatea fosfatazică a granulocitelor neutrofile prezintă valori net scăzute în leucoza mieloidă (a se vedea diagnosticul diferenţial).

Seria eritrocitară. La început, numărul de eritrocite este normal. În formele mai înaintate apare anemia şi se pot întîlni şi eritroblaşti în sîngele periferic.

Seria trombocitară. Trombocitele cresc numeric la început, apoi scad la normal.

Mielograma. Se întîlneşte o hiperplazie puternică a seriei granulocitare (fig. 162). Seria eritrocitară este slab reprezentată şi granulopoeza domină toată mielograma, cu o deviere puternică la stînga, cu un procent crescut de promielocite (măduva promielocitară). Se mai găsesc de asemenea în măduvă o creştere a eozinofiliei şi a bazofiliei, modificări calitative ale celulelor sub formă de asincronism între maturaţia nucleului, a protoplasmei şi a granulaţiilor. Se întîlnesc mitoze patologice.

Cu toate aceste semne, diagnosticul diferenţial bazat numai pe morfologie este destul de greu de făcut cu modificările medulare care însoţesc leucocitozele reacţionale foarte puternice. În astfel de cazuri, reacţia plasmocitară a măduvei este de mare folos. Plasmocitele sînt în general crescute în leucocitozele reacţionale (stări leucemoide) şi, din contra, diminuate în leucemia mieloidă cronică.

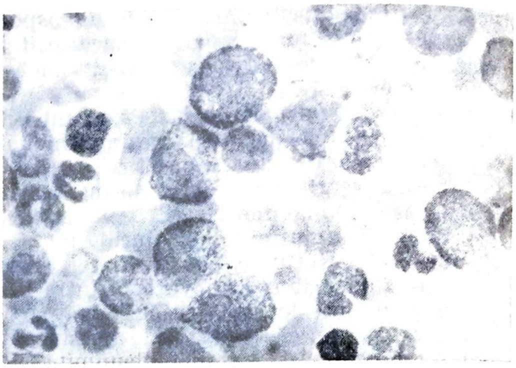


Fig. 162. — Leucoză mieloidă cronică. Măduvă sternală (acelaşi caz ca în fig. 161).

În stadii mai înaintate se constată în măduvă o participare mai intensă a sistemului reticulohistiocitar, cu prezenţa în număr mare de celule reticulare (tip Ferrata etc.).

Splina. Splenomegalia este foarte pronunţată. Splenograma arată o metaplazie predominant mielocitară.

Ganglionii limfatici sînt normali la început. Participarea ganglionilor limfatici la procesul de metaplazie în leucemia mieloidă survine destul de tardiv.

Ficatul este moderat hipertrofiat. O hipertrofie exagerată hepatică este de un prognostic defavorabil.

Forma alucemică a leucozei mieloide cronice se caracterizează printr-un număr normal sau uşor crescut de leucocite în sîngele periferic şi cu prezenţa unui mic procent de mielocite şi promielocite. Frecvent se întîlnesc eritroblaşti în sîngele periferic.

Splina este mult mărită şi splenograma arată o metaplazie pe cele 3 linii: eritroblastică, granulocitară şi megacariocitară.

După Heilmeyer, termenul de mieloză aleucemică trebuie rezervat pentru cazurile în care se găsește o hiperplazie mieloidă medulară pronunțată.

Uneori însă acest sindrom splenomegalic este însoțit de o măduvă săracă, scleroasă. În acest caz este vorba de *splenomegalia mieloidă cronică a adultului* (splenomegalie eritro-mieloidă, splenomegalie mieloidă megacariocitară, mieloză aleucemică megacariocitară). Jean Bernard insistă asupra faptului că acest sindrom trebuie deosebit de leucemia mieloidă. Raporturile lor nosologice sînt încă discutabile, dar separarea și deosebirea lor este importantă, prin faptul că evoluția și prognosticul lor este diferit.

Există sindroame false de leucemie mieloidă cu splenomegalie considerabilă, o puternică leucocitoză, cu trecerea în sîngele periferic de granulocite tinere. Aceste sindroame apar în metastazele canceroase localizate în măduvă și în splină și în tuberculoza splenică.

În caz de metastaze, diagnosticul se face prin radiografia oaselor, puncția măduvei oaselor și a splinei și descoperirea tumorii primitive. Diagnosticul tuberculozei splenice se face prin

Diagnosticul diferențial al leucozei mieloide cronice *TABELUL 82*

	Leucoză mieloidă cronică	Leucoză mieloidă aleucemică	Splenomegalie mieloidă cronică a adultului	Reacția leucemoidă
1. Etiologie	Necunoscută	Necunoscută	Necunoscută	Cunoscută: infecții, intoxicații, hemoliză acută etc.
2. Sînge periferic (devierea la stînga)	Deviere pînă la promielocit și mieloblast	Deviere pronunțată, uneori însă puțin pronunțată, pînă la mielocit	Deviere pînă la promielocit și rar mieloblast; deseori eritroblaști	Deviere de obicei mai puțin pronunțată
3. Leucocite	Foarte crescute	Normal sau ușor crescute	Normal sau ușor crescute	Crescute
4. Asociere eozinofile-bazofile	Prezentă	Prezentă	Prezentă	Absentă
5. Modificări calitative	Pronunțate	Pronunțate	Pronunțate	Puțin pronunțate
6. Mielograma	Foarte bogată în elemente granulocitare. Deviere la stînga, măduvă intens promielocitară	Foarte bogată în elemente granulocitare. Deviere la stînga, măduva intens promielocitară	Săracă în elemente, măduvă scleroasă	Bogată în elemente granulocitare, deviere la stînga mai puțin pronunțată
7. Activitatea fosfatazei alcaline	Activitate mult scăzută	Activitate mult scăzută	Activitate crescută	Activitate intens crescută
8. Splenograma	Metaplazie puternică granulocitară	Metaplazie mieloidă completă	Metaplazie mieloidă completă (eritroblaști, granulocite, megacariocite)	Metaplazie granulocitară foarte puțin accentuată sau absentă
9. Radiografie schelet	Deseori normală	Deseori normală	Osteo-mieloscleroză	Normală
10. Evoluție	3–4 ani	3–4 ani	3–10 ani	Vindecabilă
11. Acțiune terapeutică: raze X, chimioterapie	Netă	Netă	Slabă sau nulă	–

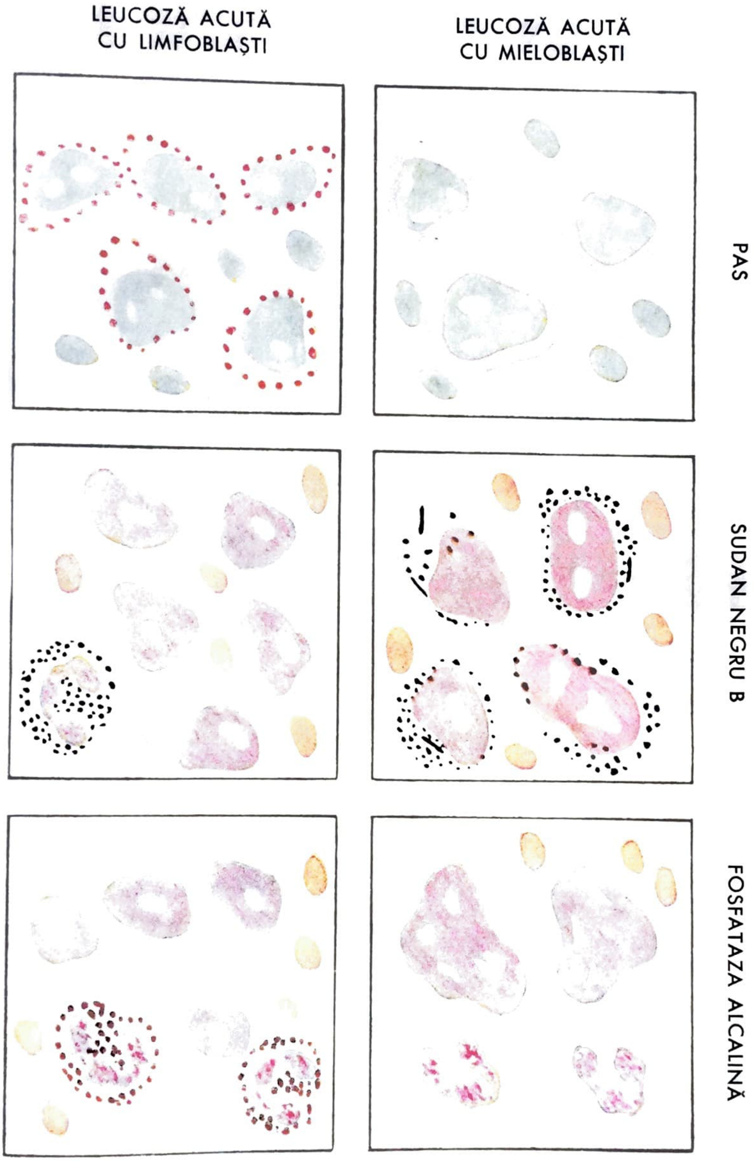

LEUCOZĂ ACUTĂ CU LIMFOBLAȘTI
LEUCOZĂ ACUTĂ CU MIELOBLAȘTI
PAS
SUDAN NEGRU B
FOSFATAZA ALCALINĂ

Fig. 164. — Date citochimice pentru confirmarea caracterului limfoblastic sau mieloblastic al unei leucoze acute.

punerea în evidență, radiologic, a calcificărilor, la nivelul splinei, prin citologia puncției splenice, prin cercetarea bacilului Koch în frotiu sau prin inoculare la cobai.

LEUCOZA LIMFOIDĂ CRONICĂ

Clinic se caracterizează prin adenomegalie generalizată, simetrică, cu ganglioni mobili, nedureroşi. Splenomegalia este moderată.

Manifestările cutanate constau în metaplazii limfoleucozice cu aspect eritrodermic, localizate mai ales pe față (leucemide).

Survine de obicei în a doua jumătate a vieții, mai frecvent la bătrîni, este rară la adultul tînăr. Limfoleucoza cronică nu se observă niciodată la copil.

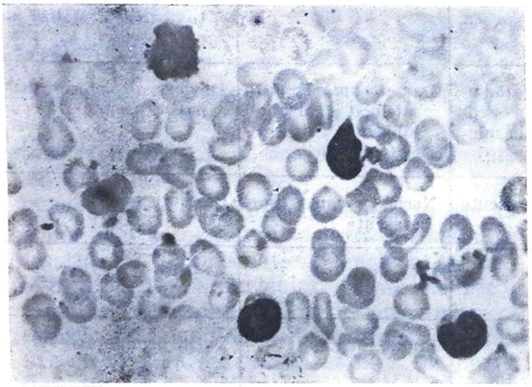


Fig. 163. — Leucoză limfoidă cronică. Sînge periferic : limfocite, umbre Grumprecht.

Sîngele periferic. În funcție de numărul de leucocite se deosebesc :

— forma leucemică se caracterizează prin număr foarte mare de leucocite, cu puternică limfocitoză : 250 000 — 300 000 leucocite/mm³, cu peste 90% limfocite în formulă ;

— forme subleucemice : număr moderat de leucocite, între 10 000 şi 30 000/mm³, cu 80% limfocite în formulă ;

— formele aleucemice : număr normal sau uşor crescut de leucocite, pînă la 10 000/mm³, cu 50 — 60% limfocite în formulă. Limfocitele sînt mici şi mijlocii, de aspect aproape normal (fig. 163). Uneori aspectul lor morfologic este de celulă limforeticulară, cu două prelungiri diametral opuse. Se pot întîlni limfocite mari cu nucleoli (limfoblaşti sau prolimfocite).

— Foarte frecvente sînt umbrele nucleare (umbre Gümprecht), care pot fi numeric tot atît de frecvente ca şi limfocitele intacte.

— Eritrocitele : anemia se instalează în perioada de debut a bolii, este moderată, dar mai accentuată decît în mieloleucoză.

— Trombocitele : uşor diminuate şi diminuează pe măsura evoluției bolii.

Mielograma arată : metaplazie intensă a sistemului reticulo-histiocitar, cu plaje întinse de limfocite (fig. 164).

Mielograma este modificată prin infiltrație limfocitară. Exemplu de formulă medulară la 100 de elemente :

Limfocite	70%
Limfoblaşti	10%
Eritroblaşti	8%
Elemente din seria granulocitară	12%
Megacariocite	rare

Mielograma din leucoza limfoidă cronică seamănă cu aceea din sindromul Waldenstrőm. În această afecțiune se constată o proliferare moderată sau puternică a măduvei osoase, caracterizată prin prezența de celule reticulare limfoide.

Aceste celule seamănă uneori cu limfocitele ; se mai pot întîlni şi unele celule denumite limfoplasmocite.

Morfologia normală a sîngelui, cît şi caracterele biochimice ale serului, ajută la punerea diagnosticului de sindrom Waldenström.

În formele aleucemice puncția sternală arată un tablou care dă diagnosticul de certitudine, măduva fiind în totalitate înlocuită cu țesut limfatic. Mielograma arată 60 — 80% pînă la 95% limfocite, unele de aspect limfoblastic. Seria eritroblastică reprezintă aproximativ 10% şi cea granulocitară cam 15 — 20%.

În puseuri acute se întîlnesc, pe lîngă limfocite adulte mici şi cu morfologie normală, elemente tinere mari, cu nucleul bilobat şi nucleoli. Numărul de leucocite creşte mult, anemia se accentuează ; trombopenia este accentuată.

Limfocitele cu granulații azurofile sînt rare în leucoza limfoidă cronică, atît în măduvă, cît şi în sîngele periferic, semn important de reținut pentru diagnosticul diferențial cu limfocitozele reacționale.

Adenograma arată o densitate celulară foarte mare, cu o monotonie celulară : aproape exclusiv limfocite şi limfoblaşti. În caz de leucocitoză moderată, cu un procent de limfocite nu prea mărit şi cu o mielogramă care nu permite diagnosticul sigur al unei metaplazii limfoide, este necesară o biopsie ganglionară sau o puncție-biopsie. Metaplazia limfoidă a măduvei sporește însă cu evoluția bolii.

Metaplazia limfoidă dominantă din limfoleucoză are loc în măduvă, după cum metaplazia mieloidă dominantă din mieloleucoză are loc în splină.

Metaplaziile limfoleucozice din organe sînt mai intinse decît cele mieloleucozice din leucoza mieloidă, căci potența de metaplazie pe linie limfoidă a sistemului reticulo-histiocitar pare să fie mai mare decît cea de metaplazie pe linie mieloidă. Astfel, organe ca pielea, intestinul, rinichiul, oasele, aparatul uro-genital răspund cu focare de limfopoeză intensă.

Diagnosticul diferențial al leucozei limfoide cronice

1. *Limfosarcomatoza* (limfocitosarcom). În limfosarcomatoză se găsește:

— Adenopatie asimetrică cu predominanța unui grup, ganglioni duri, uneori voluminoși, aderenți între ei și la țesuturile învecinate.

— Splenomegalie absentă sau moderată.

— Sîngele periferic: leucocitoză moderată cu polinucleoză neutrofilă.

— Mielogramă deseori normală. Cînd măduva este invadată, evoluție foarte rapidă.

— Adenograma arată monotonie celulară. Este greu de făcut deosebirea morfologică între un ganglion de limfocitosarcom și un ganglion de leucoză limfoidă cronică. În reticulosarcomatoză predomină, cu un procent mare celulele reticulare cu aspect monstruos, nuclei cu nucleoli giganți, multe mitoze atipice. În limfosarcomatoză predomină limfocitele. De obicei există și limfocite și celule reticulare; cînd predomină limfocitele se vorbește de limforeticulosarcom, cînd predomină celulele reticulare, de reticulolimfosarcom.

2. *Boala Hodgkin* se caracterizează prin:

— Adenopatie asimetrică cu ganglioni mobili indolori, predominînd cervical.

— Tulburări cutanate: prurit.

— Febră constantă.

— Splenomegalie moderată.

— Sîngele periferic: leucocitoză normală sau moderată, cu neutrofilie, eozinofilie, limfopenie, monocitoză.

— Mielogramă normală.

— Adenogramă: celule Sternberg, polimorfism celular (granulom) cu limfocite, granulocite, eozinofile.

3. *Tuberculoza ganglionară* caracterizată prin:

— Adenopatie asimetrică, nedureroasă, localizată deseori în regiunea cervicală; periadenită netă, deseori ganglioni ramoliți, atingere tardivă a pielii și fistulizare.

— Cutireacție la tuberculină inconstant pozitivă.

— Splină normală.

— Sîngele periferic: uneori leucocitoză cu neutrofilie, uneori limfocitoză în formele cronice.

— Mielogramă normală.

— Adenogramă: celule gigante Langhans, celule epitelioide, uneori puroi și prezența bacilului Koch.

4. *Metastazele ganglionare din cancere* se caracterizează diferențial prin:

— Adenopatie asimetrică, localizată, cu ganglioni duri, mobili.

— Splină normală.

— Sîngele periferic: leucocitoză moderată cu neutrofilie, uneori leucocitoză puternică (stare leucemoidă) cu limfocitoză.

— Mielogramă uneori normală; se pot găsi insule de celule canceroase (metastaze medulare). Dacă metastazele sînt întinse, se întîlnește o aplazie medulară pe toate liniile. Apar atunci eritroblaști în sîngele periferic.

5. *Reacțiile leucemoide* de tip limfatic (a se vedea la leucoza acută).

6. *Alte adenopatii* (a se vedea la puncția ganglionară).

LEUCOZELE ACUTE

Simptomatologia clinică cuprinde: stare generală alterată, febră (multă asemănare cu o boală infecțioasă septicemică), paloare; dureri osoase; semne bucale și faringiene, ca epistaxis, gingivoragii, ulcerații buco-faringiene; semne de diateză hemoragică (peteșii, echimoze); adenomegalia este localizată, cervicală de obicei, sau generalizată; splina în general palpabilă; ficatul în limite normale sau ușor hipertrofiat.

Unele forme evoluează cu hepato-splenomegalie pronunțată. Uneori leucoza acută evoluează fără hipertrofie ganglionară sau splenică.

Leucoza acută este excepțională la naștere, foarte rară la sugar, mai frecventă între 18 luni și 7 ani.

Sîngele periferic. Modificările caracteristice se găsesc în seria leucocitară.

Seria leucocitară. Leucoza acută se caracterizează prin prezența de celule tinere, atipice, denumite și celule blastice (leucoblaști), cu morfologie foarte variabilă (fig. 165).

Aceste celule foarte polimorfe se apropie, din punct de vedere morfologic, de mieloblast, de care însă diferă, atît prin originea lor, care este direct din celula reticulară, cît și prin morfologia lor, care prezintă o atipie pronunțată. Astfel de celule sînt denumite paramieloblaști (fig. 166).

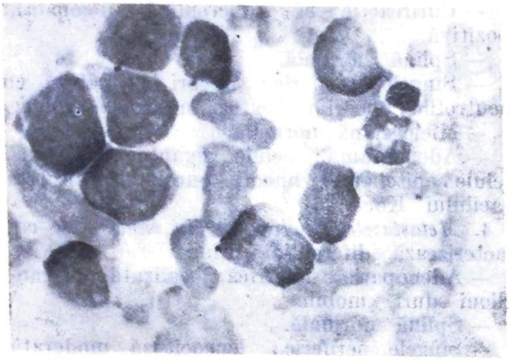


Fig. 165. — Leucoză acută. Sînge periferic.

Datorită polimorfismului acestor celule, ele au fost împărțite în mai multe categorii. După clasificarea lui Moeschlin și Rohr, se disting 4 tipuri.

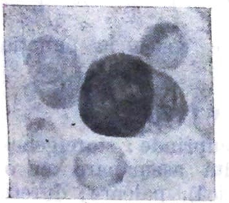


Fig. 166. — Leucoză acută. Sînge periferic : paramieloblast cu corpi Auer.

1. *Paramieloblaștii monocitoizi* sînt celule cu nucleu încovoiat, ca nucleul monocitului, cu rețea nucleară foarte laxă, semănînd cu nucleul de celulă reticulară, cu mai mulți nucleoli, cu citoplasma slab bazofilă, raportul nucleocitoplasmatic mult în favoarea nucleului.

2. *Paramieloblaștii promielocitari* seamănă cu paramieloblaștii monocitoizi, însă mai prezintă în plus granulații azurofile în protoplasmă asemănătoare cu granulațiile promielocitului. Pot avea și nucleul rotund sau aproape rotund.

3. *Paramieloblaști cu nucleul polimorf* se caracterizează printr-un nucleu foarte polimorf, lobat în mod neregulat, prin șanțuri mai înguste sau mai largi, mai adînci sau mai puțin adînci. Prezintă nucleoli. Protoplasma este slab bazofilă.

4. *Micromieloblaștii* sînt celule de dimensiuni mici, cu nucleul rotund, reticular, cu nucleol vizibil sau uneori mai greu vizibil cu foarte puțină protoplasmă în jur, dînd impresia, uneori, a unui nucleu lipsit de protoplasmă.

Micromieloblaștii seamănă cu limfocitele și pretează la confuzii cu acestea. Diagnosticul se poate face ținînd seama de marile deosebiri de talie între paramieloblaști, unele celule prezentînd aspectele caracteristice pentru paramieloblast (monocitoizi sau promielocitari, sau cu nucleu polimorf). Astfel, pe o lamă în care predomină micromieloblaștii se pot întîlni și paramieloblaști promielocitari, ceea ce pledează împotriva unei leucoze limfoide.

De asemenea, prezența de elemente cu peroxidaze pozitive pledează pentru paramieloblaști. Nu însă toți paramieloblaștii sînt peroxidazo-pozitivi în mod constant. Prezența de corpi Auer este hotărîtoare pentru paramieloblaști.

Caractere comune generale ale paramieloblaștilor. Diferența de talie între celule (anizocitoză) este o caracteristică importantă. În mod frecvent aceste celule prezintă vacuole mari și mici în protoplasmă și deseori și în nucleu. În protoplasmă se pot întîlni corpi Auer (bastonaș azurofil), caracteristică patognomonică pentru leucoza acută cu paramieloblaști. Corpii Auer se pot întîlni și în celulele reticulare din măduvă. Protoplasma este în general redusă, cu colorație palidă, albastru spre cenușiu, raportul nucleocitoplasmatic fiind mult în favoarea nucleului. Nucleolii sînt abundenți și mari.

Oxidazele și peroxidazele sînt deseori pozitive, dar pot fi și negative.

Deși există polimorfism în ceea ce privește paramieloblaștii găsiți pe o lamă, cîmpul prezintă o imagine monotonă, celelalte serii celulare fiind extrem de reduse.

Uneori paramieloblaștii din sîngele periferic nu seamănă ca tip cu cei din măduvă, fapt care poate fi explicat prin schimbarea mediului sau prin originea lor din focarele de metaplazie extramedulare (splină, ficat).

Școala franceză (J. Bernard, G. Mathé și alții) clasifică celulele din leucozele acute în următoarele 6 varietăți celulare : hemocitoblast, limfoblast, mieloblast, promielocit, monoblast, celulă leucozică monocitoidă.

Autorii precizează că această terminologie, bazată pe criterii morfologice, trebuie interpretată cu următoarea rezervă : o celulă leucozică este denumită „mieloblast'' numai prin faptul că prezintă o mare asemănare morfologică cu un mieloblast normal și în nici un caz nu se poate identifica total cu un mieloblast întîlnit la un individ sănătos.

Aceste varietăți citologice din leucozele acute sînt descrise după cum urmează:

Hemocitoblastul este o celulă de talie mare; nucleul, de asemenea mare, prezintă o cromatină fină, reticulară. Nucleolii sînt în număr mare 3 — 4 sau mai mulți. Citoplasma ușor bazofilă, puțin abundentă și lipsită de granulații. Destul de frecvent se pot întîlni corpi Auer.

Limfoblastul este o celulă de talie redusă, cu un raport nucleocitoplasmatic mult mai mare, unele celule părînd lipsite de citoplasmă sau prezentînd o mică porțiune de citoplasmă numai într-un pol al celulei. Se găsesc frecvent amitoze patologice (elemente ce conțin în aceeași citoplasmă 2 nuclei, deseori lipiți, în bob de cafea). Cromatina nucleară a limfoblastului are tendința de a forma mase mai largi neregulate. Nucleolul, de cele mai deseori unic, este puțin vizibil și uneori nu poate fi distins.

Mieloblastul este o celulă de dimensiuni egale cu hemocitoblastul, distingîndu-se de acesta prin prezența de granulații azurofile. Nucleul cu rețea fină, cu mai mulți nucleoli. Împreună cu mieloblaștii se găsesc un număr de 10 – 25% hemocitoblaști. De asemenea, se poate întîlni un număr mic de promielocite și mielocite, care confirmă caracterul mieloid al formei de leucoză. Prezența de corpi Auer nu este rară.

Promielocitul reprezintă un stadiu mai avansat, cu o citoplasmă parțial sau în totalitate policromatofilă, prezentînd frecvent o arhoplasmă; conține foarte numeroase granulații azurofile.

Monoblast (leucoze monocitare): cel puțin 50% dintre monocitele în circulație sînt tipice, de diferite grade de maturitate. Alte celule cu nucleul polimorf și lobat, segmentat, deseori cu nucleoli; citoplasmă în general abundentă, slab bazofilă; în zona perinucleară prezintă granulații azurofile.

Celule monocitoide (reticuloze acute, reticuloendotelioze acute, reticuloză histiomonocitară).

O primă noțiune care trebuie subliniată este frecvența foarte mare a coexistenței, la același bolnav, a mai multor varietăți celulare. Acest fenomen este net, mai ales la începutul afecțiunii, înainte de orice tratament, și tinde să se atenueze în timpul evoluției, pe măsură ce apar reșutele.

La varietatea de leucoză se dă numele celulei a cărei hiperplazie predomină. Astfel, după această clasificare, se numește leucoză limfoblastică forma care prezintă o hiperplazie totală sau predominantă pe linie *limfoblastică.*

Pentru adult, frecvența acestor diferite varietăți citologice este sensibil aceeași.

La copil însă predomină foarte net forma *limfoblastică*, care se întîlnește în 67% din cazuri (G. Mathé).

Această clasificare, bazată pe o simplă apreciere morfologică, prezintă o importanță prognostică: durata de viață a formelor *limfoblastice* este, în general, superioară, în comparație cu celelalte forme citologice. Acest caracter explică de ce leucozele acute cu evoluție lungă sînt mult mai frecvent întîlnite la copii.

Formele de lucoză *limfoblastică* sînt deosebit de sensibile la tratamentele actuale (corticoterapie, antipurine, antifolice), ceea ce explică evoluția lor lungă, spre deosebire de celelalte varietăți citologice de leucoză care nu răspund la tratament.

În varietatea *limfoblastică*, formele leucopenice sau normoleucocitare prezintă mult mai frecvent o evoluție lungă. Astfel s-au descris remisiuni terapeutice de 10, 18 și, în unele cazuri, de peste 20 de luni.

Criterii citochimice pentru identificarea varietăților citologice ale leucozelor acute

Completarea datelor morfologice cu reacții citochimice ajută în precizarea formei citologice a leucozelor acute.

Date citochimice pentru confirmarea caracterului mieloid sau limfoid al unei leucoze acute:

	Limfoblast	Mieloblast
1. Peroxidaze	Negativ	Pozitiv ++ inconstant
2. Substanțe sudanofile	Negativ	Pozitiv ++
3. Reacția PAS	Pozitiv ++ granulații roșii în citoplasmă	Pozitivitate difuză a citoplasmei roză-palidă difuz
4. Fosfataza alcalină	Negativă pentru limfoblast, dar intens pozitivă pentru granulocitele neutrofile ce se pot întîlni	Negativă pentru mieloblast, negativă și pentru granulocitele neutrofile ce se pot întîlni

În leucoza acută cu limfoblaşti, limfoblaştii dau reacţia peroxidazelor totdeauna negativă; reacţia pentru substanţele sudanofile (Sudan negru B) este negativă; reacţia PAS, pozitivă la majoritatea celulelor limfoblastice sub formă de granule roşii citoplasmatice pe un fond roz palid al citoplasmei; fosfataza alcalină, negativă pentru limfoblaşti, dar intens pozitivă pentru granulocitele neutrofile ce se pot întîlni pe aceeaşi lamă.

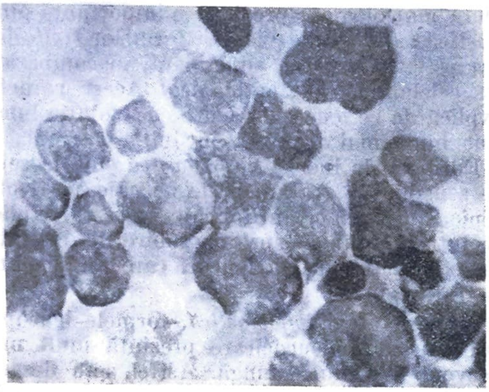


Fig. 167. — Leucoză acută. Măduvă sternală: celule blastice.

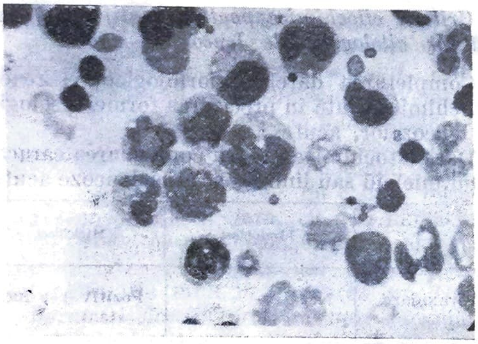


Fig. 168. — Leucoză acută. Măduvă sternală: paramieloblaşti.

În leucoza acută cu mieloblaşti, mieloblaştii dau reacţia peroxidazelor inconstant pozitiv; reacţia pentru substanţe sudanofile este pozitivă; reacţia PAS pentru mieloblaşti dă o culoare difuză roză palidă a citoplasmei; fosfataza alcalină este negativă, atît pentru mieloblaşti, cît şi pentru granulocitele neutrofile întîlnite pe aceeaşi lamă.

Elementele blastice din sînge variază numeric de la caz la caz. Se găsesc:

— forme cu leucocitoză puternică: 300 000 /mm ^{3}, forme denumite leucemice;

— forme cu leucocitoză moderată: 50 000/ mm ^{3}, denumite şi subleucemice;

— forme cu leucocitoză normală: 5 000 – 6 000/mm ^{3};

— forme cu leucopenie: 1 000 — 800/mm ^{3}, denumite forme leucopenice.

Formula leucocitară arată:

1. Prezenţa de celule blastice în proporţie de 80 — 90% şi peste 90%;
2. diminuarea granulocitelor neutrofile;
3. absenţa de forme intermediare între celulele blastice şi elementele mature ale seriei granulocitare (hiatus sau abort leucemic).

Aceste 3 caractere sînt prezente în majoritatea cazurilor. Se întîlnesc şi cazuri cu un număr mai redus de celule blastice în formula leucocitară, numărul sporind pe măsura evoluţiei bolii.

Umbrele nucleare sînt frecvente în leucoza acută, datorită fragilităţii elementelor blastice. În formula leucocitară se pot întîlni eritroblaşti.

Seria eritrocitară arată anemie constantă ajungînd uneori pînă la un milion eritrocite/mm^3.

Seria trombocitară se caracterizează prin trombopenie accentuată, sindrom hemoragic.

Simptomatologia poate să fie mai discretă, atunci cînd boala este la începutul evoluţiei; în această etapă anemia nu este accentuată, trombopenia poate lipsi, leucograma este normală sau cu foarte puţine elemente dubioase. Puncţia sternală poate să precizeze diagnosticul unei leucoze cu celule tinere la începutul evoluţiei. Totuşi, diagnosticul acestor cazuri rămîne uneori delicat şi numai evoluţia ulterioară poate să-l precizeze.

Mielograma. Examenul măduvei permite de a diagnostica leucoza acută. Acest examen este cel mai important, deoarece modificările medulare sînt mai caracteristice şi mai fidele decît cele survenite în sîngele periferic. Din acest motiv mielograma este obligatorie. Măduva este invadată şi înlocuită de o masă densă de celule blastice, care reprezintă pînă la 90% şi peste 90% din elementele medulare (fig. 167 şi 168).

Caracteristicile morfologice ale acestor elemente sînt cele ale paramieloblaştilor.

Seria eritrocitară şi granulocitară, ca şi cea trombocitară sînt slab reprezentate.

Uneori însă seriile normale, eritrocitară și granulocitară, sînt bine reprezentate în măduvă și găsim ici-colo elemente blastice sporadice în mijlocul unei hematopoeze încă normale. Astfel de cazuri, care sînt la începutul evoluției, necesită un examen atent, puncții repetate în diverse regiuni, numai un studiu aprofundat putînd tranșa diagnosticul.

Se poate întîlni în măduvă o inhibiție de maturație a seriei eritrocitare, cu tendința netă spre megaloblastoză (a se vedea la anemiile megaloblastice).

Acum, sub influența tratamentului hormonal și a antifolicelor se pot observa remisiuni clinice și hematologice de mai multe luni. Medicul de laborator trebuie, deci, să cunoască eventualitatea administrării unor astfel de tratamente, pentru a interpreta corect rezultatul examenului hematologic.

Diagnosticul diferențial al leucozelor acute

Trebuie făcut diagnosticul diferențial cu:

1. *Reacțiile leucemoide.* La copiii mici și mai ales la sugar se observă, în urma infecțiilor, tablouri sanguine care la un prim examen par suspecte de leucoză, dar care la un examen complet și aprofundat se dovedesc a fi stări leucemoide și nu leucoze.

a) Reacții mieloice se întîlnesc în diferite stări septice, în pneumonii, în sifilisul congenital, în icterul hemolitic al nou-născutului, cînd se constată leucocitoze mari pînă la 30 000, 50 000, chiar 100 000/mm ^{3}, uneori și peste această cifră. În sîngele periferic apar procente variabile de mielocite și chiar mieloblaști, însoțite de stări de anemie mai mult sau mai puțin pronunțate. În măduvă se întîlnesc toate formele de trecere, de la mieloblast pînă la metamielocit și granulocitul neutrofil; lipsește metaplazia cu elemente blastice și monotonia cîmpului, caracteristică leucozei acute.

b) Reacții limfatice se întîlnesc tot la sugari și copii. Copiii reacționează des, la infecții mai grave sau de mai lungă durată, printr-o leucocitoză ridicată cu puternică limfocitoză, datorită stării constituționale particulare.

2. *Limfocitoza fiziologică a copilului.* Numărul leucocitelor la copil este în general ridicat pînă la vîrsta de 10 — 12 ani. Limfocitoza fiziologică absolută, mult crescută în primul an (poate să atingă 7 000 limfocite/mm ^{3}) scade apoi la 4 000/mm ^{3} și ajunge la valorile de la adult, la vîrsta de 10 — 12 ani. Proporția limfocitelor este ridicată, putînd să varieze între 50 și 70%. Numărul de granulocite nu scade în general.

În mod fiziologic, la sugar se pot întîlni leucocitoze de 16 000 și 18 000 elemente/mm ^{3}, cu 80% și 90% limfocite pe formulă. Această leucocitoză cu limfocitoză fiziologică nu se însoțește nici de splenomegalie, nici de adenomegalie; numărul de eritrocite și trombocite este normal, aspectul celulelor este normal, măduva, de asemenea, normală.

3. *Limfocitoza infecțioasă acută* (boala Carl Smith). Apare de obicei între 2 și 7 ani, dar se poate întîlni și la adult. Splina și ganglionii sînt normali, numărul de eritrocite și trombocite de asemenea normal. Numărul de leucocite este foarte ridicat: 80 000 pînă la 100 000/mm ^{3}, cu limfocitoză de 60 pînă la 90%, cu elemente de morfologie normală și cu măduvă normală.

4. *Limfocitoza din tusea convulsivă.* Boala se poate întîlni la toate vîrstele. Leucocitoza poate varia între 15 000 și 100 000/mm ^{3}, în mod obișnuit fiind în jur de 25 000/mm ^{3}, cu limfocitoză de 75 — 80%. În o treime din cazuri leucocitoza și limfocitoza sînt în limite normale. Numărul de eritrocite și trombocite este normal, măduva normală.

5. *Mononucleoza infecțioasă.* Ganglionii sînt măriți de volum, dureroși, splina hipertrofiată. Lipsesc anemia și trombopenia. Leucocitoza variază între 10 000 și 30 000/mm^3. Formula leucocitară arată prezența de limfomonocite, caracterizate prin talia mare și absența sau raritatea nucleolilor. Mielograma este normală; se constată o reacție reticulară în măduvă. Serologic: reacția Davidsohn-Paul-Bunnell este pozitivă în majoritatea cazurilor.

6. *Agranulocitoza sau panmieloftizia.* Clinic, aceste afecțiuni au o mare asemănare cu leucoza acută.

Hematologic se găsește leucopenie accentuată, cu creșterea relativă a limfocitelor, care pot să ajungă la 90%, și cu scădere accentuată a granulocitelor.

Măduva este săracă, reticulară, cu rare plasmocite; lipsesc elementele blastice caracteristice pentru metaplazia din leucoză.

7. *Puseu acut de leucoză cronică.* Morfologic, este greu de diferențiat un puseu acut de leucoză mieloidă cronică sau limfoidă cronică de o leucemie acută.

Toate leucemiile cronice sfîrșesc printr-un puseu terminal acut. Din punct de vedere pur morfologic, un puseu acut de leucemie cronică nu se poate distinge de o leucemie acută. Din punct de vedere clinic, constatarea unei splenomegalii foarte pronunțate ar putea să pledeze pentru o formă cronică cu puseu acut, deoarece în leucoza acută primitivă splenomegalia este de obicei moderată.

8. *Diferențierea între leucoza limfoidă acută și leucoza cu paramieloblaști.* Singur criteriul morfologic este insuficient pentru a putea diferenția o leucoză limfoidă acută de una cu paramieloblaști, cînd aceștia din urmă sînt toți de tip micromieloblastic. Dacă printre micromieloblaști se întîlnesc și alte tipuri, în special paramieloblaști promielocitari și celule cu corpi Auer, atunci se exclude leucoza limfoidă.

Leucoza limfoidă acută se întîlnește la copii, la adult fiind rară. Reacția peroxidazelor poate fi de un real ajutor cînd este pozitivă; dar această reacție poate fi negativă și în cazul paramieloblaștilor, deci nici peroxidazele nu prezintă o bază sigură pentru diagnostic. De asemenea, adenopatia, poate fi prezentă și în leucoza cu paramieloblaști. Criteriile citochimice discutate mai sus ajută la diagnostic.

Se poate vorbi de asemenea de leucoză limfoidă acută cu certitudine, cînd este vorba de un puseu acut al unei leucoze limfoide cronice. Elementele de origine limfoidă în puseul acut au fost denumite paralimfoblaști, ele putînd prezenta diferite anomalii de formă și caractere de malignitate.

9. *Metastaze carcinomatoase medulare.* Diferențierea se face pe baza prezenței în frotiurile de puncție a elementelor străine de măduva osului, izolate sau în placarde.

10. *Infiltrații limfocitare medulare benigne.* Sugarii și copiii mici, cu anemie hipocromă feriprivă, pot prezenta o infiltrație limfocitară medulară benignă.

11. *Eritroleucozele* reprezintă o formă intermediară între eritremii și leucoze; cuprind forme acute și cronice.

Eritroleucoza acută evoluează ca o leucoză cu elemente blastice de tip paramieloblastic și cu elemente ale seriei roșii atipice — paraeritroblaști (a se vedea la eritremii). În majoritatea cazurilor, eritroleucozele se manifestă morfologic cu o proliferare a seriei eritrocitare și se pot confunda cu anemia biermeriană, datorită asemănării elementelor cu megaloblaștii. La un examen mai atent se poate deosebi morfologic, datorită atipiei celulelor, care nu sînt megaloblaști, ci paraeritroblaști.

Examenul clinic este de un prețios ajutor, punînd în evidență o splenomegalie accentuată, care nu se întîlnește în anemia biermeriană. Ulterior apar în sînge elemente paramieloblastice.

LEUCOPENII. GRANULOCITOPENII. PANCITOPENII
(Hipoplazia și aplazia medulară)

Termenul de pancitopenie indică o stare caracterizată prin diminuarea elementelor figurate ale sîngelui periferic privind toate cele 3 serii: eritrocitară, leucocitară și trombocitară.

Citopenia se poate cantona la o singură serie. Cînd citopenia interesează seria eritrocitară este vorba de o anemie; cînd interesează numai seria leucocitară este leucopenie cu granulopenie, iar cînd este atinsă seria trombocitară, se vorbește de o trombopenie.

În astfel de sindroame măduva este hipoplazică sau aplazică, uneori normală sau hiperplazică.

Atingerea izolată a seriei eritrocitare este o raritate și a fost denumită anemie aplastică sau eritroblastoftizie. Ea poate să survină în cazul unei atingeri medulare severe, sau în caz de distrugere periferică exagerată, care duce, în timp, la epuizarea centrilor hematopoetici.

Spre deosebire de seria eritrocitară, atingerea izolată a granulocitopoezei și a trombocitopoezei se întîlnește relativ frecvent.

O clasificare a diferitelor aplazii medulare este dată de schema lui Bock (fig. 169).

Cel mai adesea citopenia interesează două sau toate cele trei serii, realizînd o panmielopatie cu pancitopenie.

Clinic se constată: oboseală mare, adinamie, febră, paloare, tendință la infecții la nivelul mucoaselor, în special buco-faringiană, care prezintă leziuni ulcero-necrotice, purpură, tendință la hemoragii diverse.

Anamneza trebuie să stabilească următoarele puncte principale:

— momentul de debut al bolii;

— profesiunea: intoxicații diverse, iradiații;

— tratamente medicamentoase: piramidon, sulfamide etc. Pentru precizarea diagnosticului, se va face controlul organelor hematopoetice prin puncție splenică și ganglionară, radiografie a scheletului. Trebuie de asemenea făcute investigații pentru punerea în evidență a unui eventual cancer latent, a unei infecții tuberculoase.

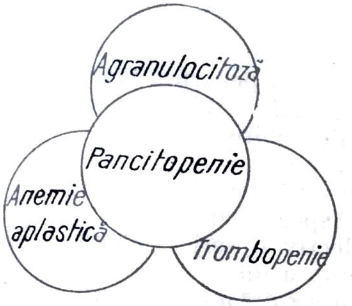


Fig. 169. — Schema Bock.

Clasificarea etiologică a citopeniilor

I. Atingere medulară prin factori exogeni

1. *Factori fizici* — radiații ionizante :

– Expuneri profesionale : radiologi, muncitori care manipulează raze X, fizicieni care lucrează cu raze X sau cu izotopi, muncitori din centralele atomice, din reactori.

– Expuneri terapeutice sau exploratoare exagerate.

– Explozii atomice.

2. *Factori chimici* :

– Benzol, tetraclorură de carbon, tricloretilen, epoxide.

3. *Factori chimici medicamentoși cu acțiune aplaziantă* :

a) Antimitotice

– Derivați azotați ai iperitei : mileran etc.

– Etilen-imine : T.E.M., T.E.P.A.

b) Antimetabolite

– Antifolice.

– Antipurinice.

c) Toxice mitoclazice (statmokinetice)

– Colchicina și derivații.

– Uretan.

– Substanțe tioloprive : sărurile de metale grele, arsenic, cloropicrină, cloracetofenona, acid monoiodacetic.

4. *Factori alimentari* : meiul învechit (Nesterov) cu acțiune inhibantă electivă asupra măduvei (aleukie toxico-alimentară).

5. *Factori inconstant nocivi asupra măduvei* : intoleranțe individuale sau sensibilizări alergice la orice doză :

– Cloramfenicol, sulfamide, piramidon, antitiroidiene, antiepileptice, arsenic, săruri de aur, dinitrofenol.

II. Obliterare medulară — Mieloscleroză, osteopetroză

Frecvent mieloscleroza aparține sindromului de splenomegalie eritro-mieloidă cronică a adultului. Uneori este secundară unor metastaze canceroase. În astfel de cazuri sînt necesare examenul radiologic și biopsia scheletului.

III. Metaplazii. Metastaze medulare

– Invadare neoplazică : metastaze osoase (cancer de sîn, de stomac, de rinichi, de prostată, simpatoame).

– Metaplazie leucemică : leucoze acute, leucoză cronică.

– Reticuloze : mielom multiplu

IV. Inhibiție medulară de origine splenică

Hipersplenism : poate avea o acțiune dublă, centrală, de inhibiție medulară, și periferică, de liză celulară eritrocitară. Măduva la început este hiperplazică.

V. Distrugere exagerată a elementelor la periferie

1. *Citopenii imunologice — Anticorpi* :

— Izoanticorpi : Transfuzie incompatibilă.
Boală hemolitică a nou-născutului.

— Autoanticorpi :

a) Provocați de medicamente : autoanticorpi alergici.

b) Provocați prin infecții : pneumonie virotică, mononucleoză infecțioasă, lupus eritematos diseminat (L.E.), infecții acute, infecție de focar ; infecția tuberculoasă trebuie cercetată sistematic.

c) Anticorpi de origine necunoscută.

2. *Toxice hemolitice* :

— Hidrogen arseniat, anilină, fenilhidrazină, fenilsemicarbazidă, venin de șarpe, ciuperci otrăvitoare, plumb.

3. *Toxice cu acțiune asupra hemoglobinei* :

— Methemoglobină.

— Sulfhemoglobină.

— Carboxihemoglobină.

— Nitriți, toluen, trinitrotoluen, anilină, acetanilidă, clorat de potasiu, oxid de carbon.

4. *Factori inconstant nocivi*, care pot provoca citopeni chiar în doze terapeutice.

Mecanismul de acțiune în astfel de cazuri este dublu :

— citopenia poate fi toxică : se vorbește atunci de intoleranță (un individ nu suportă doze uneori minime, dintr-un produs pe care alți indivizi îl suportă ușor). Acțiunea de distrugere a acestor produse este directă asupra elementelor sanguine ;

— citopenia poate fi alergică : se vorbește atunci de sensibilizare. Acțiunea citopenică se datorește unui proces imunologic prin apariția de anticorpi alergici.

a) Toxice hemolitice : sulfamide, naftalină, acid paraaminosalicilic, fenotiazină, primachină, chinină (febra bilioasă hemoglobinurică), polen de *Vicia fava* (favismul), polen de *Verbena hibrida* (anemia de Bagdad). În astfel de împrejurări s-a constatat că indivizii sensibili prezintă un deficit de glucoză-6-fosfat-dehidrogenază, enzimă eritrocitară. Această anomalie biochimică a eritrocitelor este responsabilă de acest tip de hemoliză.

b) Toxice leucocitolitice :

— Piramidonul și derivații lui.

— Sulfamide.

c) Toxice trombocitolitice :

— Sulfamide, sedormid, chinină, chinidină.

5. *Factori infecțioși*

— Infecții cronice, infecții de focar.

6. *Factori parazitari*

VI. Citopenii distrofice congenitale

a) Boala Albers-Schönberg.

b) Boala Fanconi : pancitopenie familială.

c) Anemia hipoplastică Blackfan-Diamond.

VII. Pancitopenii idiopatice

Într-un număr important de cazuri, ancheta etiologică rămîne absolut negativă. Pancitopenia se numește atunci idiopatică

EXAMENUL HEMATOLOGIC

Examenul hematologic cuprinde următoarele etape:

Sîngele periferic

1. Cercetarea pancitopeniei

— Numărătoare de eritrocite, reticulocite, valoare globulară.

— Numărătoare de leucocite, formulă leucocitară.

— Numărătoare de trombocite.

— Teste de hemostază.

2. Studiul imuno-hematologic

— Anticorpi antieritrocitari.

— Anticorpi antileucocitari.

— Anticorpi antitrombocitari.

— Anticorpi alergici (în prezența alergenului).

— Semne de hemoliză: bilirubină indirectă, stercobilină.

— Semne de leucoliză: acid uric.

— Durata de viață a eritrocitelor.

3. Măduva oaselor.

— Puncții repetate în teritorii diferite.

— Cercetare în sensul unei metaplazii leucemice, al unui mielom sau, metastaze neoplazice.

— Biopsie medulară: osteomieloscleroză.

— Studiul prin izotopi al activității medulare de distrugere eritrocitară.

4. Splină:

— Examen clinic.

— Puncție splenică.

— Studiul prin izotopi al activității de distrugere eritrocitară.

Aspectul măduvei hematogene în pancitopenii

1. *Aplazie medulară*. În ansamblu, hematopoeza este profund atinsă. Celulele sanguinoformatoare sînt extrem de rare, măduva este pustie. Rarele celule care se mai găsesc sînt din seria reticulară; se găsesc plasmocite.

2. *Hipoplazie medulară*. În diagnosticul unei pancitopenii este important de știut starea măduvei: ea nu este totdeauna pustie și țesutul hematopoetic nu dispare în totalitate, în toate cazurile.

Se poate constata frecvent o inhibiție în mecanismul de maturație la un anumit stadiu celular. Astfel, se știe că în granulocitopenii inhibiția are loc la stadiul promielocitar și rezultă un aspect de măduvă promielocitară. Cînd o pancitopenie cu măduvă aplazică se vindecă, măduva trece printr-o supraactivitate în cursul căreia se poate vedea în mod tranzitoriu o măduvă pur mieloblastică (greu de diferențiat de o leucoză acută) sau o măduvă promielocitară. Aceste stadii de refacere și reîmbogățire citologică a măduvei nu se mențin decît cîteva zile, pentru a face loc la o repartiție aproape normală a elementelor celulare medulare (spre deosebire de leucoză, unde monotonia celulară rămîne).

3. *Măduvă cu dezechilibru între serii*. Aspect care apare cînd este atinsă în mod electiv o serie, celelalte fiind normale sau moderat atinse.

4. *Măduvă normală sau hiperplaziată*. Hipersplenismul poate fi definit ca o stare însoțită de citopenie sanguină periferică, cu o măduvă cu activitate normală sau hiperplaziată, cu splenomegalie și revenirea la normal a modificărilor hematologice după splenectomie.

5. *Metastaze canceroase*: se găsesc celule izolate sau grupate, străine de măduvă.

6. *Metaplazie leucemică*: vezi caracteristicile la capitolul respectiv.

7. *Osteomieloscleroză* : la fel.

Aspectul măduvei apare deci foarte variat în diferitele stări citopenice. Privite dinamic aceste variații sînt în funcție nu numai de natura factorului nociv, ci și de intensitate și doză, de timpul cît acționează, de reactivitatea organismului asupra căruia acționează.

Tabloul sanguin și medular variază și după momentul la care s-a făcut examenul de-a lungul evoluției bolii.

Astfel, un factor nociv care acționează în doze mici poate să producă, la început, o hiperplazie medulară. Continuînd să acționeze mai departe, în timp, măduva devine hipoplazică și aplazică. Prin tratament sau prin remisiune spontană măduva se poate din nou repopula cu toate seriile celulare, în stadii succesive.

De asemenea, în caz de hipersplenism, deși la început măduva este hiperplaziată și citodiabaza frenată, dacă această acțiune continuă un timp mai îndelungat, măduva devine hipoplastică și aplastică.

Mecanismul care duce la pancitopenie poate acționa prin:

— determinarea unei insuficiente produceri de elemente sanguine în măduvă;

— exces de distrugere periferică a elementelor;

— deseori asocierea acestor mecanisme, cu predominarea unuia sau altuia.

Dacă factorul nociv acționează direct asupra măduvei, este vorba de primul mecanism, care poate să ducă la aplazie într-un timp relativ mai scurt. Dacă măduva este normală funcțional, dar elementele mature periferice sînt supuse distrugerii, cu timpul capacitatea de regenerare a măduvei este depășită și rezultatul este identic. Printr-o solicitare periferică exagerată și prelungită măduva ajunge la epuizare, la o insuficiență funcțională, deci la hipoplazie și aplazie.

Ordinea de cercetare etiologică în pancitopenii. Cercetarea etiologică într-o pancitopenie trebuie dirijată în ordinea frecvenței și gravității afecțiunilor care o determină.

1. Bolile maligne: leucoză, cancer.
2. Intoxicații prin substanțe chimice sau radiații ionizante, de obicei profesionale.
3. Intervenția substanțelor medicamentoase.
4. Hipersplenism, anticorpi.
5. Boli congenitale.
6. Cauze necunoscute, idiopatice.

BOALA DE IRADIAȚIE

Boala de iradiație poate fi produsă prin:

– *radiații penetrante*: raze X care iau naștere în aparatele speciale generatoare; raze γ provenite din dezintegrarea elementelor radioactive; neutroni produși în reacțiile nucleare. Datorită puterii lor de penetrație, aceste radiații devin nocive.

– *radiațiile* α și β, avînd o putere de penetrație foarte slabă, reprezintă un risc neglijabil. Aceste radiații pot deveni însă nocive prin acumulare în organism datorită absorbției sau injectării de corpi radioactivi.

Modul de acțiune a radiațiilor ionizante

1. *Leziunile biologice* provocate de radiațiile ionizante se manifestă în special asupra nucleului celulelor, acestea constituind un factor cu acțiune puternică antimitotică. Alterările nucleului sînt de două feluri:

– lipirea cromozomilor care apar aglutinați, se rup la nivelul centromerului, prezintă anomalii în spiralizare și formarea fusului;

– rupturi ale cromozomilor, parțiale sau definitive.

În rupturile parțiale cromozomii se pot reasocia, dar deseori această reasociere se produce după o inversare a unei părți sau după o translocare a unui fragment de cromozom pe un altul, ceea ce duce la un schimb de material cromozomic, deci la o acțiune mutagenă a radiațiilor.

2. *Leziuni biochimice.* Acțiunea radiațiilor se exercită direct asupra moleculelor ionizîndu-le:

$$RH \rightarrow R^\circ + H^\circ$$

În alte condiții, molecula primește indirect energia radiantă de la o altă moleculă:

$$RH + OH^\circ \rightarrow R^\circ + H_2O$$

Leziunile biochimice afectează îndeosebi proteinele și acizii nucleici. Activarea lor este indirectă și pornește de la radioliza apei:

$$H_2O \rightarrow OH^\circ + H^\circ$$

În prezența oxigenului apar radicali OH° și HO°_2, care reprezintă agenți oxidanți puternici. Acești radicali activează moleculele prin fixare de atomi de hidrogen:

$$RH + OH^\circ \rightarrow R^\circ + H_2O$$
$$RH + HO^\circ_2 \rightarrow R^\circ + H_2O_2$$

Iradierea apei este deci însoțită de apariția unor proprietăți oxidante puternice, pe care se bazează efectul oxigen, care reprezintă fundamentul teoriei acțiunii indirecte a radiațiilor.

Acțiunea radiațiilor asupra proteinelor. Iradierea proteinelor provoacă în general o polimerizare a lor, prin activarea moleculelor și prin reacții de pontaj care se efectuează prin intermediul legăturilor disulfurice. Acțiunea radicalilor liberi se manifestă pe funcțiile tiol, care sînt oxidate în legături disulfurice

$$2R - SH + 2OH^\circ \rightarrow R - S - S - R + 2H_2O$$
$$2R - SH + 2HO_2^\circ \rightarrow R - S - S - R + 2H_2O_2$$
$$2R - SH + H_2O_2 \rightarrow R - S - S - R + 2H_2O$$

Așa se explică denaturarea proteinelor citoplasmatice și inhibiția multor enzime, îndeosebi a celor care posedă grupări active SH. Prin aceste mecanisme se poate explica acțiunea antimitotică sau letală a radiațiilor ionizante.

Acțiunea radiațiilor asupra acizilor nucleici. Iradierea acizilor nucleici provoacă denaturarea lor prin depolimerizare, prin ruptura catenelor polinucleotidice și heterociclice ale bazelor și și prin formarea de hidroperoxizi în prezența oxigenului. Alterările acizilor nucleici (ADN și ARN) au repercusiuni profunde asupra sintezei proteinelor și provoacă oprirea mitozelor.

Toate aceste modificări provoacă ruperea echilibrului metabolic al celulei şi explică, în mare măsură, efectul citostatic.

Se ştie că durata de supravieţuire a unei celule iradiate variază invers proporţional cu activitatea depusă de celulă după iradiere. Astfel, celulele cu activitate metabolică crescută (celule sanguinoformatoare, celule tumorale) sînt deosebit de radio-sensibile.

Este important de menţionat că factorii chimici cu acţiune radiomimetică acţionează aproape la fel ca radiaţiile ionizante, realizînd exact aceleaşi leziuni şi ducînd la acelaşi rezultat (azot-iperite, etilen-imine, di-epoxide).

3. *Modificări hematologice provocate de radiaţiile ionizante.* Utilizarea din ce în ce mai largă a radiaţiilor ionizante în diferite domenii de activitate, ca medicina, biologia, industria, aplicaţiile numeroase ale energiei nucleare, au mărit posibilitatea accidentelor prin iradiere.

Aspecte etiologice. Modificări hematologice se pot observa consecutiv acţiunii:

1. *Razelor X*:

— radiologi sau alţi muncitori care manipulează razele X;

— tratamente radioterapice.

2. *Elementelor radioactive*:

— elemente radioactive naturale: radiu;

— sărurile de radiu şi de mezotorium folosite în industrie au provocat accidente prin aplazie medulară sau osteosarcoame prin localizare în oase. Aceste săruri au fost abandonate;

— elemente radioactive artificiale: izotopi radioactivi.

3. *Energiei nucleare*:

— iradieri accidentale în centrele nucleare sau prin explozia de bombe atomice.

Aspecte hematologice

Iradierile uşoare cronice dau tulburări mici, reversibile.

Seria leucocitară este prima serie atinsă. Seria eritrocitară şi trombocitară pot prezenta modificări în cazurile de iradiere mai pronunţată.

Leucopenia este de regulă prezentă: mai des o neutropenie, uneori limfopenie, destul de des limfo-neutropenie.

Se poate constata şi o leucocitoză moderată la început intermitentă, apoi durabilă. În aceste cazuri este vorba de o limfocitoză cu neutropenie. Eozinofilia este inconstantă. Uneori apare o polinucleoză neutrofilă.

Aspecte morfologice. Se pot constata alterări citoplasmatice şi nucleare ale leucocitelor: anizocitoză, granulaţii toxice, picnoze nucleare. Cele mai precoce şi remarcabile modificări privesc limfocitele, care prezintă cromatină în bulgăre, nucleu bilobat, anomalii de coloraţie.

Seria eritrocitară arată anemie moderată, uneori anizocitoză, poikilocitoză. Uneori sporesc reticulocitele.

Seria trombocitară arată uşoară trombopenie cu anizocitoză. Se observă prelungirea izolată a timpului de sîngerare şi tulburări datorite trombopeniei.

Iradierile acute grave duc la hipoplazie sau aplazie medulară. Se pot observa:

— la bolnavii iradiaţi pentru tumori sau hemopatii maligne şi insuficient supravegheaţi din punct de vedere hematologic;

— în caz de iradieri accidentale: accidente din centre atomice sau explozii de bombe atomice.

Dozele cuprinse între 200 şi 600 r provoacă tulburările hematologice cele mai evidente. Peste 600 r moartea survine în cîteva zile. Sub 200 r aplazia este parţială.

Evoluţia sindromului hematologic este următoarea:

a) *Primele 2 zile*:

— leucocitoză cu polinucleoză, limfopenie;

— eritrocitele, trombocitele, reticulocitele se menţin normale;

— hemostaza nu prezintă variaţii;

— măduva arată oprirea mitozelor.

b) *Prima şi a doua săptămînă*:

— leucopenie cu limfopenie şi neutropenie;

— scad eritrocitele, trombocitele şi reticulocitele.

— apar modificări de hemostază: timp de sîngerare crescut; timpul de coagulare poate fi crescut sau normal; consumul de protrombină este deficitar;

— măduva arată aplazie;

— se pot asocia hemoragii, infecţii.

c) *A treia şi a patra săptămînă*: există două posibilităţi:

—evoluţie spre vindecare: toate elementele eritrocitare, leucocitare şi trombocitare sporesc, hemostaza se normalizează, măduva se regenerează complet;

— evoluţie fatală: dacă după două săptămîni scăderea leucocitelor se menţine sub 2 000 şi reticulocitele sînt absente, prognosticul este grav şi aplazia medulară duce la moarte într-un timp variabil.

Bolnavii care supravieţuiesc la o astfel de iradiere sînt ameninţaţi, în timp, de apariţia posibilă a unei leucoze.

În general, iradierea predispune la leucoză. Statisticile arată că leucozele sînt de opt pînă la nouă ori mai frecvente la radiologi, decît la medicii de alte specialităţi. Este vorba de persoane iradiate timp îndelungat, cel puţin 10 ani, în condiţii de protecţie insuficientă.

De asemenea cazurile de leucoză sînt net mai frecvente în Japonia la populaţia iradiată de bomba atomică, decît în restul populaţiei.

Mai des se observă leucoze acute sau subacute, uneori leucoze mieloide cronice. Leucozele limfoide apar mai rar.

HIPERSPLENISMUL ŞI HIPOSPLENISMUL

HIPERSPLENISMUL

Hipersplenismul este un sindrom caracterizat prin:

1. Scăderea elementelor figurate ale sîngelui, fie izolat, fie în toate seriile.
2. Hiperplazie medulară în prima perioadă de evoluţie.
3. Splină în general mărită.
4. Vindecare clinică şi hematologică după splenectomie.

Hipersplenismul este o exagerare a unor funcţii fiziologice ale splinei, ca funcţia frenatoare asupra mielopoezei şi mielodiabazei, funcţia citolitică, elaborarea de anticorpi.

Această activitate a splinei se poate pune în evidenţă prin următoarele probe :

– creşterea marcată a elementelor sanguine după splenectomie practicată la un individ normal ;

– reacţie normoblastică şi mielocitară exagerată în sîngele periferic după hemoragie la un individ splenectomizat ;

– vindecarea unor citopenii prin splenectomie ;

– extractele splenice produc un sindrom citopenic prin frenarea mielopoezei şi mielodiabazei ;

– citoliza splenică excesivă (intratisulară) ;
– citoliza intravasculară prin eliberare de anticorpi litici.

Experimental, s-a demonstrat că dacă vena splenică este anastomozată cu alte vene, ocolind ficatul, se obţine o scădere netă a tututor elementelor sanguine figurate : eritrocite, granulocite, trombocite. Se admite că în mod normal principiul frenator splenic se distruge cînd traversează ficatul.

Cînd ficatul este insuficient, această distrugere este mult mai mică şi atunci principiul frenator acţionează cu intensitate, trecînd nevătămat de bariera hepatică. Starea celulei hepatice are deci un rol important în acest sindrom.

Funcţia frenatoare, funcţia citolitică şi elaborarea de anticorpi pot acţiona separat, dar de cele mai deseori se asociază.

Criteriile de indicaţie a splenectomiei. Eficacitatea şi necesitatea splenectomiei se bazează pe următoarele criterii :

a) Criterii clinice : agravarea simptomelor, repetarea lor şi ineficacitatea tratamentelor obişnuite.

b) Ineficacitatea tratamentului cu cortizon şi ACTH.

c) Mielograma : splenectomia nu se poate face decît atunci cînd măduva este activă, hiperplazică. În trombopenii prin hipersplenism, megacariograma arată o inhibiţie de maturaţie a megacariocitelor : se întîlnesc elemente pînă la megacariocitul granulat, dar nu se întîlnesc elemente trombocitogene. În purpura Werlhof această inhibiţie este şi mai pronunţată, maturaţia megacariocitelor fiind oprită la elementele bazofile negranulate. În astfel de împrejurări numărul megacariocitelor este crescut şi numai în acest caz se poate indica splenectomia.

d) Un mare progres s-a realizat în ultimul timp privitor la indicaţia splenectomiei în anemiile hemolitice. Este vorba de punerea la punct a unei metode care arată cu precizie locul de sechestrare şi distrugere a eritrocitelor marcate cu crom radioactiv.

În principiu se procedează injectîndu-se intravenos o cantitate anumită de eritrocite izogrup marcate cu Cr^{51} şi determinîndu-se în timp, la cîteva zile interval, variaţiile radioactivităţii în sîngele circulant şi ale proiecţiei pe tegumente a ficatului şi splinei.

La individul normal, activitatea în sînge scade relativ încet, spre deosebire de bolnavii cu anumite forme de anemie hemolitică, la care scăderea activităţii este mult mai rapidă.

Activitatea splinei la individul normal rămîne aproape nemodificată sau creşte neînsemnat de-a lungul zilelor, spre deosebire de bolnavii cu un anumit tip de anemie hemolitică, la care activitatea splinei creşte rapid.

Aceste rezultate arată că în anumite tipuri de anemii hemolitice splina joacă un rol de sechestrare şi distrugere exagerată a eritrocitelor

Datorită acestei metode, indicațiile splenectomiei în anemiile hemolitice pot fi puse cu mai mari șanse de succes decît se putea face altădată.

Cercetările bazate pe această metodă au permis clasificarea anemiilor hemolitice în 4 tipuri :

1. *Distrugerea eritrocitară localizată în mod electiv în splină.* Acest tip de anemie cuprinde sferocitoza congenitală (icterul hemolitic congenital), unele anemii hemolitice cîștigate cu autoanticorpi, unele ciroze. Este important de menționat că o splenomegalie nu merge paralel cu o sechestrare splenică electivă și excesivă, și invers, o sechestrare splenică excesivă poate exista chiar în absența splenomegaliei. În toate aceste forme de anemii hemolitice splenectomia poate fi indicată.

2. *Distrugerea eritrocitară localizată în mod electiv în ficat și uneori în ficat și plămîni.* Această varietate se întîlnește în unele anemii hemolitice cîștigate cu autoanticorpi la rece, anemiile însoțite de hemoglobinurie, în drepanocitoză în stadiul de atrofie splenică. Splina joacă, în aceste cazuri, un rol neglijabil sau nul, astfel încît splenectomia este ineficace.

3. *Distrugerea eritrocitară mixtă hepato-splenică.* Acest al treilea tip se întîlnește într-un număr mare de anemii hemolitice cîștigate cu sau fără autoanticorpi, în unele anemii hemolitice congenitale normocitare, în unele cazuri de hemoglobinurie nocturnă paroxistică. În aceste cazuri splenectomia nu dă rezultate sigure. Intervenția operatorie poate fi indicată dacă predomină sechestrarea în splină, dar sînt posibile eșecuri imediate sau tardive : se constată o exacerbare a sechestrării în ficat, iar volumul ficatului crește.

4. Ultimul tip este reprezentat de cazurile la care *sechestrările hepatică și splenică sînt slabe sau nule.* În astfel de cazuri se urmărește eliminarea urinară a Cr^{51}. Această eliminare poate fi inferioară față de normal și se vorbește atunci de o sechestrare tisulară difuză (întîlnită în unele forme de ciroză hepatică și în unele cazuri de hemoglobinurie nocturnă paroxistică), sau eliminarea urinară poate fi crescută, cum se întîmplă în cursul unor anemii hemolitice congenitale normocitare.

Este deci util și practic de a face această explorare în cazul unei anemii hemolitice cronice, pentru a indica, cu multe șanse de succes, splenectomia.

Se pare că corticoterapia acționează în mod deosebit asupra fenomenului de sechestrare splenică. Splenectomia nu se practică în cazurile în care măduva este hipoplazică sau aplazică.

HIPOSPLENISMUL

După splenectomie apar următoarele modificări sanguine :

Seria eritrocitară. Se constată în măduvă tulburări de maturație a nucleului eritroblaștilor care se manifestă în sîngele periferic prin apariția de eritrocite cu corpusculi Jolly. Tulburările în sinteza hemoglobinei și metabolismului fierului sînt oglindite prin creșterea numărului de sideroblaști și apariția în sînge a siderocitelor, apariția celulelor în țintă. Se mai poate constata și o creștere a rezistenței osmotice și a diametrului mediu eritrocitar.

Sîngerarea sau administrarea de substanțe hemolizante produce, la cîinii splenectomizați, apariția a de 4 ori mai mulți eritroblaști în sîngele periferic, decît la martori.

Seria leucocitară. După splenectomie se constată o hiperleucocitoză, care durează mai multe săptămîni sau luni. Cresc granulocitele, limfocitele, apare o eozinofilie.

Trombocitele cresc de asemenea după splenectomie.

Se admite că splenectomia favorizează citodiabaza elementelor imature medulare.

În clinică s-au descris anemii eritroblastice în legătură cu o atrofie splenică.

CITOPENII DISTROFICE CONGENITALE

Caracterul cronic al citopeniei, vechimea tulburărilor, vîrsta tînără a bolnavului dirijează diagnosticul spre o citopenie congenitală.

BOALA ALBERS-SCHÖNBERG

Boala Albers-Schönberg (osteopetroza esențială). Este o boală foarte rară ; pînă în prezent există aproximativ 200 de cazuri descrise în literatura medicală.

Clinic se caracterizează prin : fracturi spontane, anemie, tulburări neurologice etc.

Examenul hematologic. Tulburările sanguine se întîlnesc de obicei la copil. Caracteristică este o anemie hipocromă cu eritroblastoză periferică. Se mai poate întîlni o reacție leucemoidă, asociată cu hepato-splenomegalie.

Examenul radiologic dă indicațiile cele mai importante : extraordinară densificare a scheletului, care pare omogen ; canalul medular al oaselor lungi este dispărut.

Biochimic : bilanțul fosforului și calciului este normal.

Forma benignă este o formă latentă, compatibilă cu o viață normală. Diagnosticul se face cu ocazia unui examen radiologic.

Forma malignă se caracterizează prin fragilitate osoasă, deformații ca în rahitism, semne neurologice, anemie cu prognostic grav.

Diagnosticul diferențial se face cu osteopetrozele simptomatice, denumite și sindroame marmorate sau marmoreoze.

a) *Sindroame hematologice* : în splenomegalia mieloidă cronică a adultului (splenomegalie mieloidă megacariocitară) se întîlnește constant o osteomieloscleroză. În leucemia mieloidă cronică se poate întîlni inconstant o mieloscleroză.

b) *Marmoreoze canceroase* : în metastazele osoase canceroase densificarea pare să fie datorită unei acțiuni osteogenetice a metastazelor, cancerul primitiv rămînînd deseori latent.

c) *Marmoreoze toxice* : osteopetroză prin fluor datorită absorbției de apă conținînd fluorură de calciu. De asemenea, au fost incriminați plumbul, bismutul, fosforul.

d) *Marmoreoze endocriniene* : în special osteopetroza mixedematoasă.

BOALA FANCONI

Se observă la copil și este excepțională la adult. Începutul bolii se manifestă de obicei între 5 și 10 ani.

Examenul hematologic arată anemie normocromă pronunțată, leucopenie, trombopenie, sindrom hemoragic. Măduva este de obicei săracă, pustie ; uneori se observă însă o ușoară activitate hematopoetică.

Semne asociate. Se pot observa malformații ale degetelor (degetul mare), pigmentare brună a tegumentelor, hipogenitalism.

Evoluția este foarte gravă. Transfuziile cu sînge constituie o terapie paliativă. Moartea survine deseori prin hemoragii.

BOALA BLACKFAN-DIAMOND

Boala Blackfan-Diamond sau anemia hipoplastică a copilului mic se caracterizează printr-o citopenie care atinge cel mai adesea numai seria eritrocitară. Boala se manifestă în primele luni de viață și lipsește la naștere.

Hematologic, se caracterizează prin anemie intensă, uneori pînă la 1 milion de eritrocite/mm³, normocromă, normocitară. Seria leucocitară și trombocitară nu sînt atinse, nu se observă nici hemoliză, nici sindrom hemoragic.

Un semn important este lipsa de regenerare medulară : reticulocitele sînt scăzute. Măduva arată, fie o dispariție a eritroblaștilor, fie o oprire în maturație la diferite stadii de eritroblaști bazofili sau policromatofili.

Evoluția bolii este gravă, mortală, neinfluențată de nici un tratament. Copiii pot fi menținuți în viață numai prin transfuzii cu sînge. Boala recidivează rapid după oprirea transfuziilor.

Uneori, după 8—10 ani de supraviețuire prin transfuzii, eritropoeza se poate restabili și boala se poate deci vindeca.

Transfuziile frecvente duc la hemosideroză.

MONONUCLEOZA INFECȚIOASĂ

Este o afecțiune virotică, cu participarea preponderentă a sistemului limfatic.

Clinic se caracterizează prin :

— poliadenopatie de volum moderat, ușor dureroasă ;
— splenomegalie moderată, inconstantă ;
— angină ;
— febră.

Forme clinice :

1. Forma nervoasă : cefalee puternică, ușoară rigiditate a cefei.
2. Forma abdominală : dureri abdominale, cu grețuri și uneori vărsături. Absența apărării musculare și prezența diareei o deosebește de o colică apendiculară.
3. Forma splenohepatomegalică : formă rară.
4. Forma icterică.
5. Forma mediastinopulmonară : bronșită cu adenopatie hilară sau traheobronșică.
6. Forma hemoragică : epistaxis, ușoară hematurie, purpură cutanată uneori asociată cu hemoragii mucoase.

Examenul hematologic arată modificări mai ales în seria albă.

Seria leucocitară : numărul de leucocite este moderat crescut : 10 000—15 000 pînă la 30 000. Foarte rar se pot întîlni forme cu 60 000—80 000 de leucocite pe mm³. În 10% din cazuri numărul de leucocite poate fi normal sau subnormal. Leucopenia se constată mai frecvent în prima săptămînă de boală, urmată întotdeauna de leucocitoză care atinge maximum între a 5-a și a 12-a zi.

Formula leucocitară arată un număr mare de elemente mononucleare, variind între 60 și 80%.

Citoplasma este cenușie-palidă, la unele destul de intens bazofilă, uneori cu vacuole.

Aceste elemente mononucleate se prezintă pe aceeași lamă cu o variabilitate netă de formă, de dimensiuni și de afinitate tinctorială. Un aspect particular este intensitatea bazofiliei pe marginea citoplasmei multor din aceste elemente.

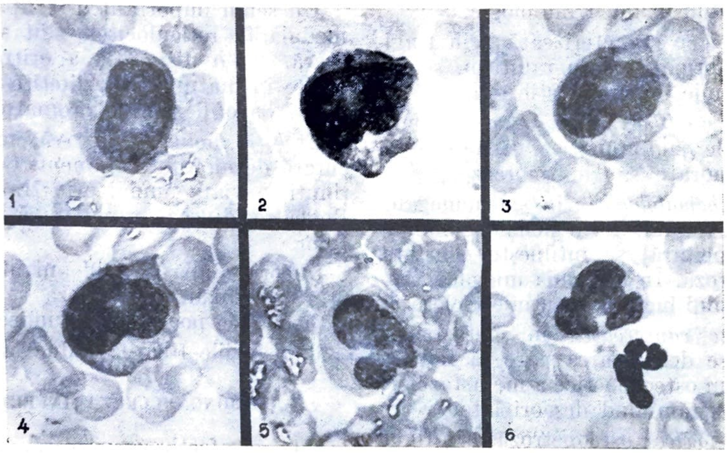


Fig. 170. — Mononucleoză infecțioasă : *1—4* ; elemente mononucleate (limfomonocite) ; *5*-monocit ; *6*-monocit și granulocit neutrofil.

Aceste celule de talie mare sînt denumite de unii autori limfomonocite. Nucleul lor este uneori rotund sau oval, alteori alungit rectangular, atingînd marginea citoplasmei pe o singură porțiune sau în două porțiuni diametral opuse.

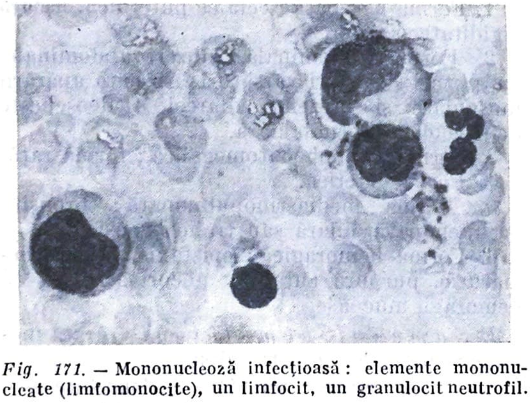


Fig. 171. — Mononucleoză infecțioasă : elemente mononucleate (limfomonocite), un limfocit, un granulocit neutrofil.

Uneori nucleul este scobit. Aspectul nucleului este mai uniform structurat decît al limfocitului, cu trama cromatiniană laxă ; nu prezintă nucleoli decît rareori.

De la caz la caz și după stadiul evolutiv al bolii, predomină, fie celulele mononucleate de tip limfocitar, fie cele de tip monocitar.

La începutul evoluției este faza elementelor de tip limfocitar, urmată apoi de elementele de tip monocitar și la sfîrșitul evoluției predomină net limfocitele tipice care anunță convalescența.

Polimorfismul și hiperbazofilia unor elemente, prezența, într-un procent variabil, de plasmocite și celule cu evoluție plasmocitară evidentă reprezintă un aspect caracteristic al tabloului hematologic al mononucleozei.

Seria eritrocitară și plachetară : eritrocitele, hemoglobina și trombocitele prezintă valori normale.

În convalescență se poate întîlni o ușoară anemie hipocromă. Foarte rar se poate întîlni o anemie hemolitică sau posthemoragică.

Mielograma este normală sau prezintă o reacție reticulară.

Aspectul măduvei, fără metaplazie, anemia absentă sau moderată şi trombocitemia normală permit evitarea unei confuzii cu leucoza acută.

Diagnosticul serologic se face prin reacţia Paul-Bunnell-Davidsohn. Aceasta se pozitivează la sfîrşitul primei săptămîni, titrul fiind 1/1 000 pînă la 1/2 000, sau chiar mai mare. Titrul creşte şi atinge maximum la sfîrşitul săptămînii a doua. Constatarea acestei creşteri a titrului de anticorpi heterofili are cea mai mare valoare diagnostică.

În unele cazuri, reacţia nu se pozitivează decît după 15 sau 20 de zile de la începutul bolii. Reacţia este uneori negativă, cu toate că clinic şi hematologic boala este sigur o mononucleoză. Se admite că indivizii de grupă sanguină A (II) nu răspund prin formarea de anticorpi heterofili cînd sînt bolnavi de mononucleoză, reacţia Paul-Bunnell-Davidsohn fiind deci negativă la aceştia.

Diagnosticul diferenţial (a se vedea diagnosticul diferenţial al leucozei acute) se face cu:

- Reacţii leucemoide limfatice.
- Limfocitoza fiziologică a copilului.
- Limfocitoza infecţioasă acută (Carl Smith).
- Limfocitoza din tusea convulsivă.
- Leucoza acută.
- Toxoplasmoza (găsirea parazitului în celulele sistemului reticulo-histiocitar, reacţiile serologice de fixare a complementului).

EXAMENUL SÎNGELUI PERIFERIC. HEMOGRAMA

A. VARIAȚII FIZIOLOGICE ALE NUMĂRULUI ELEMENTELOR SÎNGELUI PERIFERIC

Eritrocite

Variații după sex :
- bărbat adult 4 500 000 – 5 500 000/mm³
- femeie adultă 4 000 000 – 5 000 000/mm³

Variații după vîrstă :
- la naștere 4 500 000 – 7 000 000/mm³
- pînă la 12 ani 4 000 000 – 5 000 000/mm³

Hemoglobina

Variații după sex :
- bărbat adult 14 – 17 g pentru 100 ml sînge
- femeie adultă 12 – 16 g pentru 100 ml sînge

Variații după vîrstă :
- la naștere 20 – 25 g pentru 100 ml sînge
- la 10 ani 12 – 16 g pentru 100 ml sînge

Reticulocite
- adulți 4 – 18 la 1 000 eritrocite
- la naștere 30 – 50 la 1 000 eritrocite

Leucocite
- adulți 4 000 – 9 000/mm³
- la naștere 15 000 – 25 000/mm³

Formula leucocitară

	Elemente %	Elemente/mm³
— Granulocite neutrofile	50 – 70	3 000 – 4 500
— Granulocite eozinofile	1 – 4	100 – 200
— Granulocite bazofile	0 – 1	20 – 60
— Limfocite	20 – 40	1 200 – 2 400
— Monocite	4 – 8	240 – 480

În mod fiziologic elementele hemogramei variază nu numai în funcție de sex și de vîrstă. La aceste variații se adaugă cele care survin în cursul unei activități musculare mai intense, în timpul digestiei, în funcție de anotimp, de altitudine (poliglobulie).

Un efort muscular intens produce o leucocitoză marcată. De asemenea, după un prînz bogat în proteine numărul leucocitelor crește. Alimentele la care sînt sensibilizați determină, la unii indivizi, leucopenie. Hemograma trebuie deci recoltată pe nemîncate.

În timpul sarcinii crește numărul de leucocite în mod fiziologic, pînă la 14 000/mm³. În timpul travaliului numărul de leucocite poate să crească pînă la 28 000 – 30 000/mm³, ajungînd la o cifră maximă în timpul expulziei fătului. Creș-

TABELUL 83

Variațiile formulei leucocitare și ale numărului de leucocite în funcție de vîrstă

(după J. Bernard)

Număr/mm³	Nou-născut	9 luni	3 ani	10 ani	Adult
	10 000 – 20 000	4 000 – 15 000	4 000 – 11 000	5 000 – 10 000	5 000 – 10 000
	%	%	%	%	%
Neutrofile	60 – 70	25 – 40	35 – 50	45 – 60	50 – 70
Eozinofile	1 – 2	1 – 4	1 – 4	1 – 4	1 – 4
Bazofile	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1
Limfocite	20 – 25	50 – 70	45 – 60	40 – 50	30 – 45
Monocite	12	8	6	6	6
Mielocite neutrofile	0,5	0	0	0	0

terea interesează în primul rînd granulocitele neutrofile, care ajung la peste 90%. Această cifră scade după 24 de ore de la naştere la cifre foarte apropiate de normal, în 4—5 zile leucocitele revenind la cifrele normale. În cazurile în care după 24 de ore cifra de leucocite scade cu mai puţin de 3 000 elemente/mm³ faţă de cifra maximă din timpul expulziei, sau cînd în loc să scadă, ele cresc peste cifra maximă, se anunţă o complicaţie infecţioasă (febră puerperală), ale cărei semne clinice apar după 2—3 zile (V. Kondi).

TABELUL 84

Cifrele medii ale leucogramei la diferite vîrste
(după Sturgie şi Bethell)

Vîrstă	Leucocite/mm³	N %	E %	B %	L %	M %
Nou-născut	15 000—25 000	60	2—3	0,5	22—30	5—10
10 zile	8 000—14 000	40—43	2—3	0,5	42—45	5— 7
4— 6 luni	11 000—13 000	25—30	2—3	0,5	52—68	4— 7
10—12 luni	9 000—12 000	27—32	2—3	0,5	57—62	4— 7
4 ani	8 500—10 500	41—45	2—3	0,5	45—48	3— 5
7 ani	8 000—10 500	41—50	2—3	0,5	33—48	3— 5
12 ani	7 000— 8 400	41—52	2—3	0,5	30—40	4— 7
15 ani	6 500— 8 400	51—65	2—3	0,5	23—42	4— 6
Adult	6 000— 7 400	55—67	2—3	0,5	23—33	4— 6

B. VARIAŢII PATOLOGICE ALE NUMĂRULUI ELEMENTELOR SÎNGELUI PERIFERIC

1. *Creşterea numărului de eritrocite*:

a) Poliglobulia esenţială (boala Vaquez).
b) Poliglobulii secundare.
c) Leucemie mieloidă în faza de început.

2. *Diminuarea numărului de eritrocite:*

A se vedea la clasificarea anemiilor.

3. *Creşterea numărului de granulocite neutrofile*:

a) Leucoză mieloidă
b) Poliglobulii
c) Eritremii
d) Hemoliză acută
e) Hemoragii acute
f) Infecţii supurative
g) Tetanos
h) Reumatism poliarticular acut
i) Neoplasm evolutiv, boala Hodgkin
j) Stare postoperatorie sau posttraumatică
k) Uremie, comă diabetică, arsuri, eclampsie etc.

4. *Diminuarea numărului de granulocite neutrofile*:

a) Aplazie medulară, agranulocitară
b) Boli infecţioase (febră tifoidă, parotidită epidemică, tuberculoză miliară, poliomielită)
c) Malarie, kala-azar
d) Unele septicemii
e) Hipersplenism
f) Şoc anafilactic

5. *Creşterea numărului de granulocite eozinofile*:

a) Parazitoze
b) Boli de piele (psoriazis, eczeme etc).
c) Scarlatină (a treia zi după erupţie)
d) Manifestări alergice (astm, edem Quinke etc.)
e) Neoplasm, boala Hodgkin
f) Leucoză mieloidă, leucoză cu eozinofilie
g) Sindrom Löffler

6. *Scăderea numărului de granulocite eozinofile*:

a) Infecţii generale
b) Administrare de cortizon, ACTH, adrenalină

7. *Creşterea numărului de granulocite bazofile*:

a) Leucoză mieloidă, leucoză cu bazofile
b) Eritremie
c) *Hemoliză cronică*
d) Injectare de seruri

8. *Creşterea numărului de limfocite*:

a) Leucoză limfoidă
b) Limfocitoză constituţională
c) Limfocitoză fiziologică la copil
d) Limfocitoză acută (boala Carl Smith)
e) Tuse convulsivă, rubeolă, tuberculoză, sifilis, convalescenţă în bolile infecţioase
f) Mononucleoză infecţioasă (limfomonocite)

9. *Scăderea numărului de limfocite*:

— Febră tifoidă gravă, tifos exantematic

10. *Creşterea numărului de monocite*:

a) Reticuloze
b) Reticuloză histio-monocitară
c) Infecţii (tuberculoză, tifos exantematic, endocardită lentă sau acută, variolă)
d) Malarie, kala-azar
e) Boala Hodgkin, boala Gaucher, boala Niemann-Pick

11. *Creşterea numărului de trombocite*
12. *Scăderea numărului de trombocite*
} a se vedea la trombocitopenii şi trombocitopatii.

EXAMENUL ORGANELOR HEMATOPOETICE

I. PUNCȚIA MEDULARĂ (ARINKIN)

Locurile de elecție pentru puncția medulară la adult sînt : sternul, creasta iliacă, apofizele vertebrelor lombare.

La copil este preferabilă puncționarea platoului tibial, a crestei iliace.

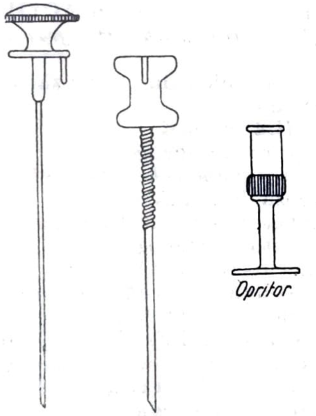


Fig. 172. — Ac de puncție osoasă (Klima și Rosegger).

Material necesar :

— Ac de puncție.

— Seringă de 10—20 cm³, sterilizată prin căldură uscată.

— Seringă de 2 ml și ace pentru anestezie.

— Novocaină fiole 4% sau 8%.

— Tinctură de iod și alcool; lame.

Acul de puncție osoasă trebuie să fie din oțel inoxidabil și prevăzut cu un mandren care să se adapteze perfect la bizoul acului, continuîndu-l. Diametrul acului trebuie să fie mai mare de 1 mm, de obicei, 1,2 mm. Este preferabil ca acul să fie prevăzut cu un opritor reglabil, care să regleze lungimea de pătrundere. Acul trebuie să fie adaptabil la seringă.

Atît acul de puncție, cît și materialul de anestezie și seringile se sterilizează prin autoclavare.

Puncția sternală

Tehnică. Locul de elecție este la nivelul spațiului al II-lea sau al III-lea intercostal pe linia mediană. Bolnavul stă culcat pe spate. Se aseptizează pielea cu alcool și apoi cu tinctură de iod. Se face anestezia tegumentelor pînă la periost cu 1—2 ml novocaină 4—8% (la copii 1%). Se așteaptă 5—10 minute, pînă

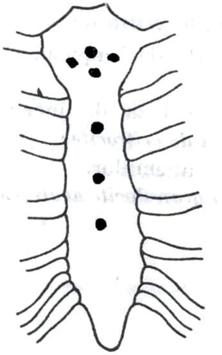


Fig. 173. — Puncte de elecție pentru puncția sternală. A nu se puncționa în dreptul coastelor.

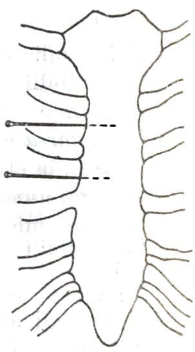


Fig. 174. — Puncție sternală pe cale laterală.

se instalează anestezia. Acul prevăzut cu mandren se înfige perpendicular pe piele. Se străpung tegumentele pînă cînd la vîrful acului se simte rezistența osoasă. Se oprește străpungerea, se reglează opritorul acului la 5 mm adîncime, după care se străpunge tăblia osoasă, preferabil printr-o mișcare ușoară de rotație. De obicei operatorul simte momentul străpungerii osului. O dată acul străpuns în cavitatea osoasă se extrage mandrenul și se adaptează seringa sterilă și perfect uscată. Se aspiră puternic cu pistonul; în seringă apare lichidul medular roșu. În acel moment bolnavul simte o durere sternală de scurtă durată. Se trage brusc acul cu seringa adaptată la el, iar pe locul de puncție se aplică un tampon cu tinctură de iod.

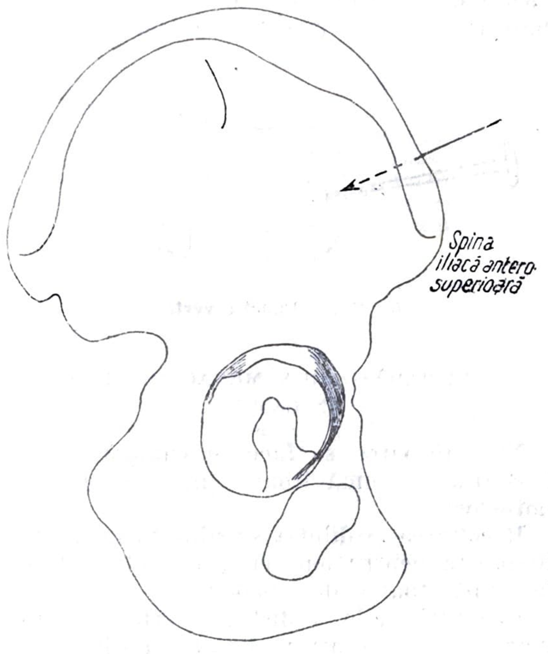


Fig. 175. — Puncție iliacă.

Conținutul seringii se trece rapid într-o sticlă de ceasornic sau pe o lamă. Din lichidul medular se fac numărători de elemente nucleate și de reticulocite. Apoi se întind frotiuri pe lame pentru examenul morfologic. Este de dorit ca aceste frotiuri să cuprindă fragmente de țesut medular, care sînt ușor de recunoscut prin aspectul lor de grunji albicioși care se depun rapid pe lamă sau în sticla de ceasornic.

La copii se preferă puncționarea sternului pe cale laterală, în spațiul al II-lea sau al III-lea intercostal. În acest caz, acul se dirijează orizontal, perpendicular pe marginea sternului.

Accidente : cînd se lucrează corect, nu se produce nici un accident la puncția sternală.

Contraindicații : în hemofilie.

Cauzele puncției albe pot fi următoarele :

— obliterarea acului cu un fragment osos, atunci cînd mandrenul nu se adaptează bine;

— nepătrunderea în cavitatea medulară;

— măduvă scleroasă.

Puncția iliacă

Locul de elecție, la adult, este la circa 5 cm înapoia spinei iliace anterosuperioare, pe creasta iliacă.

Tehnică. După aseptizare și anestezie, acul de puncție se introduce perpendicular pe creasta iliacă, prin mișcări de rotație lente, astfel încît acul să pătrundă între tăblia externă și cea internă a osului și paralel cu ele. Acul se introduce pe o adîncime de 2—3 cm.

Puncția spinei iliace postero-superioare

Bolnavul stă în decubit ventral lateral cu coapsele flectate pe abdomen sau în poziția obișnuită pentru puncția lombară. Se palpează creasta iliacă mergînd antero-posterior pînă ce se întîlnește proeminența care corespunde spinei iliace posterosuperioare ce se află situat la 4,5 cm de linia mediană și 8—9 cm de linia orizontală ce unește partea de sus a celor două creste iliace. Acul se introduce pe o adîncime de 1—2 cm.

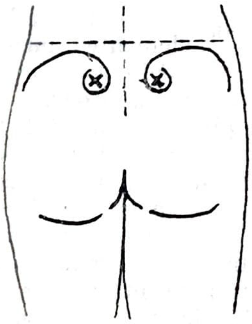


Fig. 176. — Puncție iliacă în spina postero-superioară.

Puncția tibială

Puncția tibială este cea care se practică obișnuit la copii, deoarece pînă la vîrsta de 5 ani se instalează anestezia. Acul prevăzut cu mandren se înfige perpendicular pe piele. Se străpung tegumentele pînă cînd la vîrful acului se simte rezistența osoasă. Se oprește străpungerea, se reglează opritorul acului la 5 mm adîncime, după care se străpunge tăblia osoasă, preferabil printr-o mișcare ușoară de rotație. De obicei operatorul simte momentul străpungerii osului. O dată acul străpuns în cavitatea osoasă se extrage mandrenul și se adaptează seringa sterilă și perfect uscată. Se aspiră puternic cu pistonul; în seringă apare lichidul medular roșu. În acel moment bolnavul simte o durere sternală de scurtă durată. Se trage brusc acul cu seringa adaptată la el, iar pe locul de puncție se aplică un tampon cu tinctură de iod.

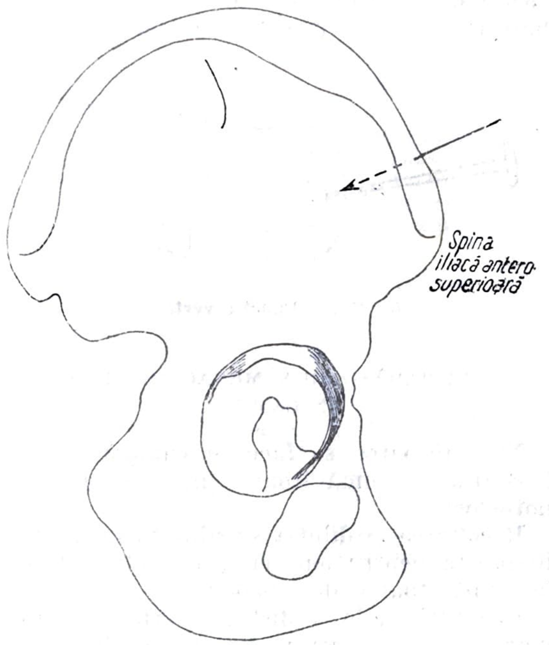


Fig. 175. — Puncție iliacă.

Conținutul seringii se trece rapid într-o sticlă de ceasornic sau pe o lamă. Din lichidul medular se fac numărători de elemente nucleate și de reticulocite. Apoi se întind frotiuri pe lame pentru examenul morfologic. Este de dorit ca aceste frotiuri să cuprindă fragmente de țesut medular, care sînt ușor de recunoscut prin aspectul lor de grunji albicioși care se depun rapid pe lamă sau în sticla de ceasornic.

La copii se preferă puncționarea sternului pe cale laterală, în spațiul al II-lea sau al III-lea intercostal. În acest caz, acul se dirijează orizontal, perpendicular pe marginea sternului.

Accidente : cînd se lucrează corect, nu se produce nici un accident la puncția sternală.

Contraindicații : în hemofilie.

Cauzele puncției albe pot fi următoarele :

— obliterarea acului cu un fragment osos, atunci cînd mandrenul nu se adaptează bine;

— nepătrunderea în cavitatea medulară;

— măduvă scleroasă.

Puncția iliacă

Locul de elecție, la adult, este la circa 5 cm înapoia spinei iliace anterosuperioare, pe creasta iliacă.

Tehnică. După aseptizare și anestezie, acul de puncție se introduce perpendicular pe creasta iliacă, prin mișcări de rotație lente, astfel încît acul să pătrundă între tăblia externă și cea internă a osului și paralel cu ele. Acul se introduce pe o adîncime de 2—3 cm.

Puncția spinei iliace postero-superioare

Bolnavul stă în decubit ventral lateral cu coapsele flectate pe abdomen sau în poziția obișnuită pentru puncția lombară. Se palpează creasta iliacă mergînd antero-posterior pînă ce se întîlnește proeminența care corespunde spinei iliace posterosuperioare ce se află situat la 4,5 cm de linia mediană și 8—9 cm de linia orizontală ce unește partea de sus a celor două creste iliace. Acul se introduce pe o adîncime de 1—2 cm.

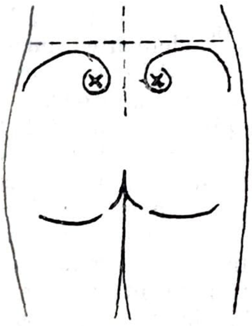


Fig. 176. — Puncție iliacă în spina postero-superioară.

Puncția tibială

Puncția tibială este cea care se practică obișnuit la copii, deoarece pînă la vîrsta de 5 ani sternul este moale și subțire, deci riscul de accidente este mai mare.

Puncția tibială se face la circa 1—2 cm sub tuberozitatea tibiei, pe fața sa internă. Această puncție trebuie făcută cu prudență, deoarece hematomul format poate determina tulburări în creșterea ulterioară a osului, cartilajul de creștere fiind în această zonă.

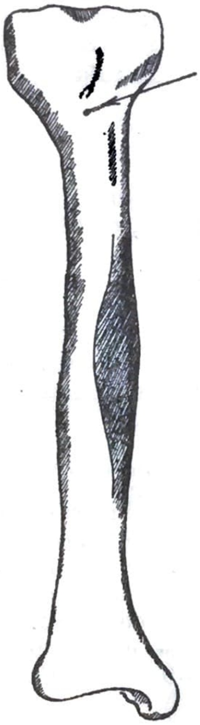


Fig. 177. — Puncție tibială.

Puncția calcaneului

Se face pe fața internă, în mijlocul osului perpendicular pe suprafața sa. Această cale se utilizează la copii.

Puncția vertebrală

Se face în apofiza spinoasă a ultimelor vertebre dorsale și, mai ales, a primelor vertebre lombare, bolnavul fiind în poziție șezînd. Acul se introduce în os pe o adîncime de 1—1,5 cm.

MIELOGRAMA

1. NUMĂRĂTOAREA ELEMENTELOR NUCLEATE DIN MĂDUVĂ

Pentru a afla numărul de elemente nucleate/mm^3 din măduvă se procedează ca la numărătoarea de leucocite. Se utilizează pipeta și lichidul de diluție (soluție de acid acetic) pentru leucocite. Recoltarea în pipetă, din sticla de ceasornic, se face imediat după puncția medulară. Ținînd seama de numărul mare de elemente nucleate care se găsesc în măduvă se recomandă o diluție mai mare decît 1/20; recoltînd sînge pînă la diviziunea 0,2, diluția este de 1/50.

Numărătoarea se face în camerele de numărat obișnuite.

Rezultate: în mod normal se găsesc 70 000—100 000 de elemente nucleate/mm^3.

În această cifră sînt cuprinse toate elementele nucleate, indiferent de serie.

Metoda permite o privire de ansamblu asupra stării proliferative a măduvei. Adăugîndu-i-se examenul formulei medulare, se poate aprecia care din sistemele medulare este modificat.

Metoda dă variații mari, chiar la normal, datorită diluției variabile a lichidului medular cu sîngele periferic, în timpul puncției. Mai există și variații regionale în ceea ce privește densitatea celulară, chiar la normal, dar mult mai pronunțate în cazuri patologice.

Variații patologice: numărul elementelor nucleate din măduvă crește în leucoze, poliglobulii (hiperplazii) și scade în aplazii medulare.

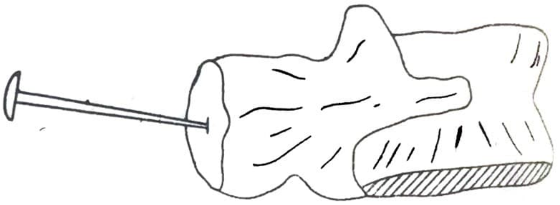


Fig. 178. — Puncție vertebrală.

2. NUMĂRĂTOAREA MEGACARIOCITELOR ÎN CAMERĂ

Numărătoarea se face în cameră Nageotte (descrisă la numărătoarea în cameră a eozinofilelor).

Recoltarea și diluția sucului medular se fac în pipeta pentru leucocite, cu soluția folosită la numărătoarea de leucocite.

Megacariocitele se disting perfect, fiind elemente de 4—6 ori mai mari decît celelalte celule medulare, cu nucleul neregulat, cu citoplasma cu margini nete.

Valori normale: 10—30 megacariocite/mm^3.

3. FORMULA MEDULARĂ

Prin formulă medulară se înțelege determinarea procentuală a elementelor din fiecare serie: granulocitară, eritrocitară, trombocitară, reticulo-histiocitară.

Metoda: se numără 100 de elemente granulocitare, seriile eritrocitară și reticulară raportîndu-se la cele 100 de elemente granulocitare.

Exemplu:

— seria granulocitară: mieloblaști, promielocite, mielocite, metamielocite, granulocite mature = 100;

— seria eritrocitară: eritroblaști = 30;

— seria reticulară = 15.

Pentru o imagine mai corectă, se recomandă ca formula medulară să fie stabilită pe minimum 500 de elemente.

Formula medulară normală

Seria granulocitară	Mieloblaşti		0,5— 1,5 %
	Promielocite		1 — 4 %
	Mielocite	N	14 —20 %
		Eo	0,5— 3 %
		B	—
	Metamielocite	N	10 —15 %
		Eo	—
		B	—
	Granulocite nesegmentate	N	14 — 26 %
		Eo	—
	Granulocite segmentate	N	10 —25 %
		Eo	1 — 4 %
		B	0,5— 1 %
Seria eritrocitară normală (la 100 de elemente granulocitare)	Proeritroblaşti		0,8— 3
	Eritroblaşti bazofili		6 — 8
	Eritroblaşti policromatofili		14 —16
	Eritroblaşti ortocromatofili		8 —10
	Promegaloblaşti		—
Seria megaloblastică (la 100 de elemente granulocitare)	Megaloblaşti	bazofili	—
		policromatofili	—
		ortocromatofili	—

Megacariograma (la 100 de elemente megacariocitare):

Seria trombocitară	Megacarioblaşti	0 — 0,5 %
	Promegacariocite	2 — 5 %
	Megacariocite granulate netrombocitogene	45 —58 %
	Megacariocite granulate trombocitogene	26 —30 %
	Nuclei liberi de megacariocite	5 —10 %
	Total megacariocite la 1 000 de elemente nucleate	0,2— 2
Sistemul reticulohistiocitar (la 100 de elemente granulocitare)	Celule reticulare limfoide mici	10 în total
	Celule reticulare limfoide mari	
	Celule Ferrata	
	Plasmocite	
	Eozinocite	
	Mastocite	
	Macrofage	
	Celule endoteliale	
Seria limfocitară	Limfoblaşti	—
	Limfocite mari	—
	Limfocite mici	1 — 5 %
Seria monocitară	Monocite	0 — 2 %

Cercetarea megacariocitelor: megacariocitele se caută uşor cu obiectivul mic uscat, fiind astfel uşor reperabile, apoi fiecare celulă este cercetată cu imersia, pentru a preciza gradul ei de maturaţie.

În general, se numără aproximativ 50—60 de elemente şi se face megacariograma, raportînd la 100 de megacariocite.

4. RAPORTUL GRANULOCITE/ERITROBLAŞTI

Simbolic, acest raport este $\frac{G}{E}$

Exemplu: mieloblaşti + promielocite + mielocite + metamielocite + nesegmentate + segmentate = 100; eritroblaşti = 33.

$$\text{Raportul} = \frac{G}{E} = \frac{100}{33} = 3$$

Normal, raportul este de 3—4.

Variaţii patologice: în hiperplaziile seriei roşii raportul scade la 1 şi sub 1; în hiperplaziile seriei albe, acest raport creşte.

5. RETICULOCITOZA MEDULARĂ

Pentru numărătoarea reticulocitelor din măduvă se procedează ca pentru numărătoarea reticulocitelor în sîngele periferic. Imediat după puncţia medulară se adaugă 2—3 picături de lichid medular în amestecul de oxalat de sodiu cu albastru briliant de crezil. Restul operaţiilor sînt cele care au fost descrise la tehnica de numărătoare a reticulocitelor.

Normal se găsesc 30—50 de reticulocite la 1 000 de eritrocite. În măduvă se găsesc şi elemente din clasa 0.

Semnificaţie : creşterea reticulocitelor din măduvă este un semn de regenerare. Modificările numărului de reticulocite din măduvă survin în împrejurările descrise în capitolul privitor la reticulocitele din sîngele periferic.

6. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII PROLIFERATIVE A MĂDUVEI

Indice mitotic este numărul de mitoze la 1 000 de elemente capabile de proliferare din seria respectivă.

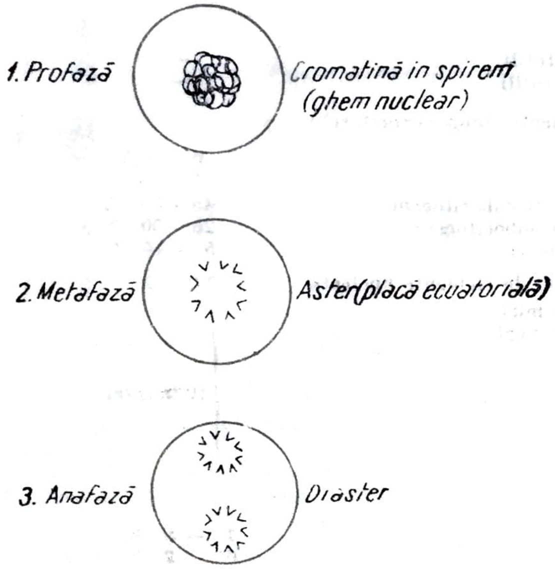


Fig. 179. — Fazele mitozei.

Indicele mitotic pentru granulopoeză este de 3—10 la mia de elemente.

Indicele mitotic pentru eritropoeză este de 12—30 la mia de elemente.

Indicele mitotic global nu redă suficient de fidel activitatea proliferativă, deoarece cresc atît elementele în mitoză, cît şi cele în repaus, raportul putînd fi neschimbat chiar în proliferări intense.

Mitograma cercetează procentual fazele mitozei pentru o serie anumită. Cu cifrele obţinute se construiesc curbele mitotice.

Pentru seria eritrocitară, la individul normal, se găsesc următoarele proporţii : profază 20% ; metafază 50% ; anafază 18% ; telofază 12%.

Repartiţia mitozelor după vîrsta eritroblaştilor : eritroblaşti bazofili 30% ; eritroblaşti policromatofili 50% ; eritroblaşti oxifili 20%.

Interpretarea curbelor mitotice : în caz de inhibiţie a mitozelor predomină profazele ; în caz de stimulare a mitozelor predomină anafazele.

7. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII DE MATURAŢIE A MĂDUVEI

Caractere biochimice ale maturaţiei. Caracterul biochimic esenţial este conţinutul considerabil în acid ribonucleic al citoplasmei la celulele tinere (dă bazofilia) şi scăderea lui pe măsură ce celula se maturează.

Caractere morfologice ale maturaţiei. Redăm succint aceste caractere pentru celulele tinere şi cele mai evoluate.

a) Caracterele celulelor tinere :

— sînt mai mari decît cele mature ;

— raportul nucleo-citoplasmatic (N/C) este foarte ridicat, nucleul fiind mare ;

— cromatina are structură fină ;

— nucleul prezintă unul sau mai mulţi nucleoli, care sînt cu atît mai mari, cu cît celula este mai tînără ;

— citoplasma este bazofilă şi nu prezintă granulaţii specifice.

b) Pe măsură ce celula evoluează, se maturează, apar următoarele modificări :

— talia se reduce ;

— raportul N/C diminuează ;

— nucleul pierde nucleolii, devine mai mic, cromatina devine mai densă, se colorează mai intens, mai închis ;

— citoplasma îşi pierde bazofilia şi devine acidofilă şi cîştigă proprietăţi specifice seriei (granulaţii specifice, hemoglobină etc.).

Termenul *blast* indică o celulă tînără cap de serie.

Termenul *cit* indică celula matură (face excepţie mielocitul).

Datorită faptului că nu există o maturaţie bruscă, formele de trecere sînt numeroase şi unele caractere se suprapun.

Legea sincronismului de evoluție nucleo-citoplasmatică. În mod normal, evoluția citoplasmei este paralelă cu a nucleului: la un nucleu tînăr corespunde o citoplasmă tînără și la un nucleu matur, o citoplasmă matură.

Acest sincronism se poate deregla în diverse circumstanțe patologice. Maturație mai rapidă a citoplasmei decît a nucleului se observă în anemiile megaloblastice; megaloblaștii se prezintă cu nucleul tînăr pentru o citoplasmă mai evoluată. În seria granulocitară se pot întîlni, în unele împrejurări, granulații specifice la promielocit sau la mieloblast. În astfel de cazuri se vorbește de asincronism de maturație nucleo-citoplasmatic.

Caractere de malignitate celulară. Foarte puține din aceste modificări sînt patognomonice pentru malignitate, dar asocierea lor poate da indicații valabile.

– Pentru nucleu: anizonucleoză, polimorfie, inversarea raportului nucleo-citoplasmatic în favoarea nucleului, hipercromazie, mitoze anormale, mărirea numărului și a dimensiunilor nucleolului.

– Pentru citoplasmă: anizocitoză, polimorfie, reacții anormale la colorație (bazofilie, cianofilie etc.), vacuolizări, fagocitoză celulară, corpi Auer.

Aprecierea activității de maturație

Curba de maturație se stabilește separat pentru seria eritrocitară și pentru seria granulocitară.

1. *Seria eritrocitară.* Curba de maturație este înscrierea grafică a numărului de eritroblaști, bazofili, policromatofili și ortocromatofili la 100 de eritroblaști.

Normal:

Eritroblaști bazofili	20 %
Eritroblaști policromatofili	48 %
Eritroblaști ortocromatofili	32 %

Variații patologice:

– crește procentul de eritroblaști bazofili (deviere spre stînga); se întîlnește în anemii feriprive, în anemii megaloblastice, în eritremii;

– crește procentul de eritroblaști ortocromatofili: anemii hemolitice.

2. *Seria granulocitară.* Curba de maturație este înscrierea grafică a numărului de mieloblaști, promielocite, mielocite, metamielocite.

Normal:

– Mieloblaști	3 %
– Promielocite	12 %
– Mielocite	40 %
– Metamielocite	45 %

Indicii de maturație sînt util de precizat pentru aprecierea activității de maturație.

1. *Seria eritrocitară*: raportul între eritroblaștii policromatofili și ortocromatofili față de eritroblaștii bazofili:

$$\frac{\text{Eritroblaști policromatofili} + \text{ortocromatofili}}{\text{Eritroblaști bazofili}} = 3-4 \text{ la normal}$$

În caz de inhibiție de maturație cresc eritroblaștii bazofili; raportul scade.

Un raport crescut indică: măduvă hiperplazică, cu maturație normală sau accelerată (anemii hemolitice).

2. *Seria granulocitară.* Pentru această serie indicele de maturație este raportul între granulocitele adulte (nesegmentate și segmentate) față de promielocite, mielocite și metamielocite:

$$\frac{\text{Granulocite adulte (nesegmentate} + \text{segmentate)}}{\text{Promielocite} + \text{mielocite} + \text{metamielocite}} = 1$$

8. SEMNIFICAȚIA MODIFICĂRILOR MEDULARE PUSE ÎN EVIDENȚĂ PRIN CERCETAREA MIELOGRAMEI

— Măduvă hiperplazică: creșterea numărului de elemente medulare, fie global, pe toate seriile (poliglobulie), fie pe o serie anumită.

— Măduvă hipoplazică: anemii hiporegenerative.

— Măduvă aplazică: anemii aplastice, pancitopenii.

— Măduvă cu numărul de megacariocite crescut, cu predominanța formelor imature: boala Werlhoff.

— Măduvă mieloblastică — creșterea exagerată a numărului de mieloblaști = leucoză acută.

— Măduvă cu paramieloblaști de diferite tipuri: leucoză acută.

— Măduvă promielocitară: în leucoza mieloidă cronică sînt prezente toate seriile granulocitare, cu un număr foarte crescut de promielocite. În agranulocitoză, în anumite stadii de evoluție a bolii, se poate întîlni o măduvă promielocitară sau mieloblastică.

— Măduvă mielocitară și metamielocitară : leucoză mieloidă cronică, stări infecțioase. Numărul de promielocite este de asemenea crescut.

— Măduvă cu neutrofile nesegmentate : stări infecțioase acute.

— Măduvă limfocitară : metaplazia limfoidă din leucoza limfoidă cronică și din limfosarcomatoză. La copii se întîlnește uneori un număr crescut de limfocite în măduvă în infecții banale, ca și în anemia feriprivă a sugarului.

— Măduvă reticulară : în reticuloze, în leucopenii, agranulocitoze, pancitopenii.

— Măduvă plasmocitară : în mielomul multiplu (plasmoblaști, plasmocite) ; în infecții cronice se găsește un număr crescut de plasmocite de aspect normal.

— Măduvă cu celule Gaucher : în boala Gaucher.

— Măduvă megaloblastică : anemie Biermer sau anemii megaloblastice nebiermeriene. În leucoze acute se pot întîlni, de asemenea, megaloblaști în măduvă.

— Măduvă grasă : anemie aplastică.

— Metastaze medulare : celule canceroase în placard și izolate (cancer de prostată, de sîn, melanoblastom etc.).

9. PARTICULARITĂȚI ALE MIELOGRAMEI LA SUGARI

Mielograma sugarului, spre deosebire de a adultului, prezintă un procent ridicat de eritroblaști. De asemenea, există o mare fragilitate a sistemului hematopoetic privind citodiabaza : elementele imature, ca eritroblaști, mielocite, celule reticulare uneori, trec ușor din măduvă în sîngele periferic și pot da naștere la interpretări și diagnostice eronate.

Pe lîngă reacția eritroblastică a măduvei, la sugar se poate observa uneori existența unei infiltrații limfocitare. Măduva de sugar conține deseori limfocite și pare capabilă de o limfopoeză accesorie, cu forme mai mult sau mai puțin evoluate, grupate pe frotiu.

Carența de fier (anemie hipocromă) asociată cu alte carențe (rahitism) se însoțește frecvent de splenomegalie, care cedează la un tratament adecvat.

Trebuie ținut seama de toate aceste particularități, pentru a evita diagnostice eronate, de hemopatii maligne.

II. PUNCȚIA GANGLIONARĂ
(după Virgil T. Ionescu)

Pentru puncție se vor utiliza ace cu vîrf bine ascuțit, de 3—5 cm lungime și diametrul exterior de 1—1,5 mm, sau ace Küss pentru pneumotorax, iar aspirația se va face cu seringă de 20 cm^3, sterilă, uscată.

După degresarea și badijonarea regiunii cu tinctură de iod, se imobilizează ferm masa ganglionară între degetele mîinii stîngi și se puncționează brusc, intrînd cu acul prin piele pînă la formațiunea tumorală ; anestezia prealabilă cu novocaină este inutilă. Se aspiră cu seringa, trăgînd pistonul la maximum. Dacă tumoarea este dură și la aspirație nu iese suc sau fragmente tisulare albicioase, se face vid în seringă și se malaxează tumoarea în fața acului, imprimînd acestuia mișcări mici și scurte, în toate sensurile. Dacă aspirația este fructuoasă, se încetează tracțiunea asupra pistonului, se scoate acul, iar orificiul pielii se acoperă cu o picătură de colodiu.

Produsul aspirat în seringă sau rămas în lumenul acului este proiectat cu pistonul pe o lamă, sau este ridicat de pe pereții seringii cu o pipetă Pasteur sau cu ace lungi. Cu o lupă se aleg fragmentele albicioase (pulpă tumorală) și se fac frotiuri pe mai multe lame, prin apăsare cu o altă lamă. Fragmentele mai mari pot fi păstrate în soluție de formol 10%, pentru eventuale examene histologice. În lipsa acestor fragmente se vor face frotiuri din picăturile cu aspect sanguinolent, în care avem șanse să găsim celule tumorale. Produsele puriforme vor fi examinate proaspăt, între lamă și lamelă ; se fac frotiuri citologice și bacteriologice, eventual însămînțări sau inoculări la animale. Dacă se extrage lichid serosanguinolent sau sanguinolent, se centrifughează, și din sediment se fac frotiuri.

Produsele puriforme nu vor fi interpretate macroscopic, ci pe frotiuri, pentru a evita greșeli cu rezultate uneori foarte grave. Destul de frecvent, metastazele ganglionare carcinomatoase prezintă mase necrotice, care apar în seringa de puncție sub formă de mase cazeiforme sau puriforme ; este ușor de presupus ce efect poate avea incizarea sau excizarea unui astfel de ganglion, pe simpla indicație dată de aspectul macroscopic.

Colorarea. Frotiurile vor fi colorate imediat după uscarea lor la temperatura camerei, cu metoda May-Grünwald-Giemsa, modificată de Virgil T. Ionescu (vezi tehnici pentru seria leucocitară).

«Este preferabil ca puncţia tumorii să fie executată de citolog; el examinează clinic bolnavul, constatînd întinderea bolii, îşi alege locul de elecţie pentru puncţie şi apreciază necesitatea altor investigaţii complementare: hemograma, mielograma, VSH, puncţii la nivelul altor localizări tumorale, control radiologic mediastino-pulmonar şi osos, examenul otorinolaringologic etc.» (Virgil T. Ionescu).

Utilitatea puncţiei ganglionare. Puncţia ganglionară reprezintă indicaţia cea mai frecventă şi mai utilă a biopuncturii în general.

În faţa unei adenopatii nu se va începe cu biopsia. Se va examina întîi hemograma şi eventual mielograma, spre a se elimina existenţa unei leucoze, în care biopsia nu poate furniza decît informaţii vagi şi uneori eronate.

VALOAREA DIAGNOSTICĂ A PUNCŢIEI GANGLIONARE

Tumori maligne. Acestea sînt reprezentate prin diversele boli de sistem reticulo-histiocitar şi de metastazele tumorale.

1. *Hemopatii maligne.* Caracteristicile acestora vor fi redate în capitolul referitor la sistemul reticulo-histiocitar: limfogranulomatoza malignă, limfosarcoamele, reticulosarcoamele, histio-reticulosarcomul, leucoze cu tumori (sarcoleucoze).

2. *Metastaze carcinomatoase.* Se găsesc celule străine de ţesutul ganglionar, izolate sau dispuse în placarde mici şi mari care amintesc de dispoziţia epitelială, cu ciment intercelular. Interpretarea frotiurilor este relativ uşoară pe preparatele bogate în celule şi placarde tumorale, exceptînd metastazele de epiteliom nediferenţiat, cu celule tinere (carcinomatoză mamară acută, unele epitelioame nediferenţiate ale cavumului), în care confuzia posibilă cu reticulosarcomul face necesară confruntarea cu aspectul histologic pe material de biopsie.

3. *Metastazele tumorilor melanice*: în acest caz se pun în evidenţă celulele cu pigment melanic, caracteristice.

Tumori ganglionare benigne se pot găsi în tuberculoză şi alte inflamaţii.

1. *Tuberculoza ganglionară.* Diagnosticul se bazează pe prezenţa celulelor epitelioide şi a celulelor gigante Langhans.

Celulele epitelioide sînt celule cu nucleu oval foarte alungit, cu reţeaua cromatiniană fină, conţinînd 2—3 nucleoli mici (1 μ diametru), net delimitaţi. Diametrul mare al nucleului este de 18—20 μ, cel mic de 5—8 μ. Citoplasma este slab bazofilă, cenuşie, rău delimitată. Grupurile de celule epitelioide pot apărea ca aglomerări de nuclei, căci citoplasma se distinge greu.

Celulele gigante Langhans sînt elemente de talie mare (30—100 μ diametru), cu nuclei numeroşi: 5—10—30—40 de nuclei. Nucleii au structura identică cu cea a nucleilor celulelor epitelioide, însă deseori sînt mai rotunzi. Citoplasma este violacee, în coloraţie Giemsa.

Pe frotiu se mai găsesc limfocite şi relativ frecvent granulocite neutrofile. Predominanţa granulocitelor indică tendinţa la ramolire a ganglionului: granulocitele şi celulele reticulare apar vacuolizate, nucleii prezintă o structură cromatiniană ştearsă, omogenă şi picnotică. Se întîlnesc frecvente aspecte de macrofagie.

Prezenţa celulelor epitelioide sau a celulelor Langhans permite punerea diagnosticului.

Celule epitelioide asemănătoare se pot întîlni, în afară de tuberculoză, numai în boala Besnier-Boeck-Schaumann.

2. *Adenite inflamatoare microbiene sau micozice.* În astfel de cazuri, pe frotiuri se pot găsi, alături de elementele caracteristice puroiului, bacterii şi respectiv micelii.

Tumori benigne extraganglionare laterocervicale. Acestea sînt reprezentate, după Virgil T. Ionescu, prin:

1. *Chisturi congenitale* constituite de un diverticul al mucoasei faringiene. Puncţia poate scoate un lichid gălbui, uneori puriform, ca puroiul de abces rece. Frotiul citologic cuprinde: celule epiteliale plate, izolate, rar alipite în placarde, avînd un nucleu mic central şi citoplasmă etalată, plicaturată. Caracteristice sînt celulele clare, fără nucleu.

2. *Limfangioamele chistice* sînt vaste cavităţi limfatice conţinînd lichid gălbui apos sau tulbure, sanguinolent (formaţiuni angiomatoase). Citologic, sedimentul centrifugat prezintă: limfocite, limfoblaşti, macrofage cu pigment sanguin (în lichidele hemoragice).

3. *Chist hidatic*: în sediment se vor căuta cîrlige, scolecşi sau vezicule proligere.

4. *Tumori parotidiene.*

5. *Tumori ale glandei submaxilare.*
6. *Tumori tiroidiene.*

III. PUNCȚIA SPLENICĂ

Material necesar:

— Ac lung de 10 cm, cu diametrul de 0,8—1 mm, prevăzut cu un mandren și cu apărătoare de oprire reglabilă.

— Seringă de 20 cm³.

— Seringă și ace pentru anestezie.

Tehnica:

Poziția bolnavului: bolnavul este pus în decubit dorsal; puncția se face în inspirație forțată, cu oprirea respirației.

Delimitarea organului: înainte de efectuarea puncției operatorul trebuie să-și facă o imagine precisă a topografiei organului, prin percuție și palpare în poziție de respirație mijlocie, apoi în inspirație forțată. Cu un creion dermograf se delimitează limita superioară a matității.

Locul puncției: puncția se face cu cel puțin 6—7 cm mai jos de limita superioară a matității, în plină zonă de matitate. Acest punct al puncției se găsește aproape totdeauna la 4—5 cm în afara marginii cartilajului falselor coaste, între liniile axilare anterioară și mijlocie, în spațiul al IX-lea sau al X-lea intercostal.

Anestezia: după o dezinfecție minuțioasă a tegumentelor se face anestezia locală cu novocaină 2%. Se face o mică papulă dermică, apoi se introduce acul perpendicular 1—1,5 cm în profunzime, pentru a anestezia straturile pînă aproape de diafragm și seroasa peritoneală. Atingerea seroasei produce o ușoară durere peritoneală. Se reperează această profunzime a acului cu ajutorul degetului.

Puncția propriu-zisă: la distanța stabilită (cu acul de anestezie) se adaugă 1—2 cm, reglînd la această lungime opritorul acului de puncție. Este necesar de a nu intra mai mult de 1—2 cm în splină, pentru a evita vasele mari ale hilului.

Acul de puncție se introduce pe traiectul acului de anestezie, în țesutul subcutanat, în spațiul intercostal, razant pe marginea superioară a coastei. În acest moment se scoate mandrenul și se adaptează o seringă de 20 cm³. Bolnavul face o inspirație profundă, nu mai respiră, stă nemișcat. În această poziție acul de puncție se introduce pînă la opritor și se aspiră brusc și energic, o dată sau de două ori. Se lasă pistonul liber, pentru a anula vidul în seringă, apoi se retrage acul cu totul.

Se întind frotiuri din materialul conținut pe ac. Se pot face și examene histologice, prin includerea fragmentelor.

După puncție bolnavul stă în pat cel puțin 6 ore. Nu se fac puncții splenice la bolnavi ambulatori.

Contraindicațiile puncției splenice: diateze hemoragice, splenomegalii de natură infecțioasă, spline dureroase prin tensiune capsulară exagerată sau prin infarct. Este necesară o mare prudență în caz de hipertensiune portală sau în vena splenică (sindrom Banti, tromboza venei splenice, ciroză splenomegalică).

Puncția este permisă numai în caz de splină net hipertrofiată.

Splenograma normală: în amprentele pulpei splenice, în stare normală, 60% din celule sînt din seria limfocitară, 30% aparțin seriei reticulo-histiocitare și restul de elemente sînt granulocite din sîngele periferic.

Importanța puncției splenice nu constă în stabilirea formulei, ci în constatarea, fie a unei metaplazii, fie a atipiilor celulare.

Utilitate, indicații. Puncția splenică poate fi utilă în:

— Leucoza mieloidă aleucemică, cînd sîngele periferic nu prezintă suficiente date pentru precizarea diagnosticului; în astfel de cazuri se constată o metaplazie mieloidă pe toate liniile: granulocitară, eritroblastică, megacariocitară.

— Depistarea limfogranulomatozei maligne (boala Hodgkin), în formele abdominale pure, fără adenopatie periferică.

— Tuberculoza splenică izolată.

— Tezaurismoze (boala Gaucher).

IV. PUNCȚIA FICATULUI

În hematologie, puncția ficatului este mai puțin utilizată în scop diagnostic, deoarece puncțiile medulară, ganglionară și splenică dau indicații sigure asupra eventualelor metaplazii în bolile de sistem.

Material necesar:

— Acul de puncție: pentru puncția-biopsie acul trebuie să aibă un diametru de 0,8—1 mm, mandren cu vîrful bine ascuțit; acele terminate cu 4 vîrfuri ascuțite sînt mai bune. Dacă se urmărește examenul pe frotiu se poate utiliza și ac subțire.

— Seringă de 10—20 cm³, cu aspirație bună.

Tehnica:

Controlul bolnavului: se execută testele complexe ale hemostazei.

Calea axilară transpleurală. Prin percuţie pe linia axilară posterioară se determină matitatea superioară a ficatului şi limita inferioară. Puncţia trebuie făcută în plină matitate, în spaţiul al IX-lea sau al X-lea intercostal, pe linia axilară posterioară, regiune care corespunde topografic cu fundul de sac pleural drept şi diafragmul, fapt pentru care este necesară evitarea puncţiei la bolnavii cu afecţiuni pulmonare sau pleurale.

Se face o anestezie locală cu novocaină 2%, injectîndu-se 2—4 mm, infiltrînd progresiv planurile pe care le străbate acul între fasciculele muşchilor intercostali.

Bolnavul este aşezat în decubit lateral stîng. Se străpung tegumentele cu acul prevăzut cu mandren, mergînd razant pe marginea superioară a coastei, perpendicular pe tegumente. Se recomandă bolnavului să rămînă în inspiraţie profundă şi nemişcat. Se introduce acul rapid în profunzime; de la suprafaţa pielii se pătrunde în total 6—7 cm. Cînd se trece prin capsula hepatică în parenchim se întîmpină o oarecare rezistenţă. Se retrage mandrenul, se adaptează seringa, se aspiră cu pistonul şi se extrage acul cu seringa, fără a face vid. Se aplică un tampon.

Se exprimă conţinutul din ac pe o sticlă de ceasornic şi se fac amprente şi frotiuri pe lame. Fragmentele mai mari se pot fixa pentru tehnici histologice.

După puncţie bolnavul trebuie să stea 6 ore culcat, mai mult pe partea dreaptă. Dacă prezintă tuse supărătoare, i se administrează o injecţie cu pantopon. Nu se fac puncţii hepatice la bolnavii ambulatori.

Calea anterioară. Ficatul se abordează pe calea anterioară numai în caz de hepatomegalie, cînd ficatul întrece suficient marginea falselor coaste; puncţia se face aproape de acestea, acul fiind îndreptat oblic în sus. Restul precauţiilor sînt identice ca pentru calea axilară.

Indicaţii, rezultate. Din punct de vedere hematologic, frotiul colorat cu metoda panoptică poate arăta, după caz, elemente mieloide, eritroblastice, megacariocitare, în diferitele tipuri de metaplazii.

Poate arăta prezenţa de celule tumorale în cancerul primitiv sau metastazic al ficatului; placarde de celule neoplazice.

Examenul histologic poate pune diagnosticul de ciroză, hepatită cronică, amiloidoză hepatică.

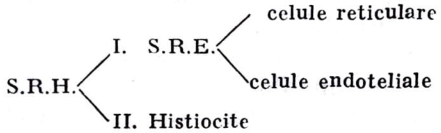
Frotiul, colorat corespunzător, poate să pună în evidenţă unele modificări ca degenerescenţa grasă, depuneri de pigmenţi: bilă, fier.

SISTEMUL RETICULO-HISTIOCITAR

Într-o încercare de clasificare a celulelor sistemului reticulo-histiocitar se pot deosebi două mari grupe:

I. Sistemul reticulo-endotelial format din celule reticulare şi celule endoteliale.

II. Grupul histiocitar.



Sistemul reticulo-endotelial este format din celule reticulare care căptuşesc reţeaua de reticulină care constituie scheletul organelor hematopoetice (măduva oaselor, ganglionii limfatici, splina). Aceste celule au prelungiri ramificate, care se unesc între ele, formînd un reticul celular; sînt deci celule fixe. Celulele endoteliale care căptuşesc sub formă de endoteliu sinusurile medulare, splenice şi ganglionare, capilarele sinusoide din ficat, corticosuprarenală, hipofiză şi endoteliile vaselor circulaţiei generale sînt celule fixe legate sinciţial.

Grupul histiocitar este constituit din celule răspîndite în întreg ţesutul conjunctiv lax, în special perivascular.

Celulele sistemului reticulo-histiocitar sînt foarte diferite din punct de vedere morfologic şi fiziologic. Ele sînt grupate predominant în unele organe, dar se găsesc răspîndite şi în tot restul organismului.

Ceea ce a permis gruparea acestor celule disparate într-un sistem funcţional unitar este o proprietate esenţială a majorităţii componentelor sistemului reticulo-histiocitar, şi anume facultatea de a îngloba în citoplasmă, în anumite condiţii, particule mai mari şi mai mici din substanţele cu care vin în contact. Astfel, aceste celule sînt capabile, între altele, de a fixa coloranţi vitali acizi, ca albastrul de tripan, albastrul de pirol, roşul de Congo, tuşul de China etc.

Celulele endoteliale au protoplasmă abundentă, alungită, foarte palidă, rău delimitată, elefiind legate sinciţial. Nucleul este reticular, fuziform.

Ele mărginesc sinusurile măduvei hematogene, capilarele sinusoide hepatice (celula Kupffer), sinusurile splenice (splenocitul).

Celulele histiocitare se întîlnesc în întreg ţesutul conjunctiv, sub forma unor celule care emit prelungiri, graţie cărora se mobilizează cu uşurinţă şi care au importante proprietăţi fagocitare. Aceste celule corespund celulelor descrise de Ranvier, sub numele de clasmatocite, precum şi „poliblaştilor" sau celule migratorii în repaus cu potenţă hematopoetică, descrise de Maksimov. Aceste celule poartă numele de histiocite. Din punct de vedere hematologic sînt cuprinse sub denumirea de hemohistioblast.

Histiocitele sînt celule de origine ale monocitelor, care se întîlnesc în mod normal în sîngele periferic ca formă migratorie a histiocitului.

Unele forme histiocitare prezintă o morfologie şi funcţii speciale. Astfel sînt: eozinocitul tisular (histiocit eozinofil, eozinocit), celula bazofilă tisulară (mastocit, heparinocit), care sînt celule reticulare histiocitare diferenţiate.

În măduva hematogenă, celulele reticulo-histiocitare puse în evidenţă în mielogramă sînt în număr mic. Numai în unele sindroame patologice se întîlneşte o hiperplazie a elementelor reticulo-histiocitare medulare în dauna elementelor hematoformatoare. Uneori histiocitul poate evolua către fibroblast şi fibrocit; această transformare este întîlnită în sclerozele incipiente ale splinei, în anemii aplastice sau în pancitopenii, în mieloscleroză. Fibroblastul și fibrocitul sînt celule foarte alungite, cu prelungiri citoplasmatice, cu nucleul fuziform.

MORFOLOGIA CELULELOR SISTEMULUI RETICULO-HISTIOCITAR DIN MĂDUVA HEMATOGENĂ

Caractere generale. O caracteristică morfologică comună majorității celulelor reticulare din măduva hematogenă este structura fină și laxă, uneori buretoasă, a cromatinei nucleare, fără aglomerări mari de cromatină și cu prezență de nucleoli, de obicei 1—2—3, dar mergînd uneori pînă la 5—6. Un mare număr din aceste celule apare pe frotiuri sub aspectul unor nuclei fără citoplasmă în jur, aspect datorit traumatizării celulei în timpul întinderii frotiului de măduvă. Pentru același motiv uneori acești nuclei apar ca umbre nucleare.

Citoplasma acestor celule prezintă afinități tinctoriale diferite : în general este palid-cenușie, cu margini neregulate, uneori fără limite nete, prezentînd sau nu granulații azurofile, mai fine sau mai grosolane. Deseori, se întîlnesc în citoplasmă vacuole de diferite mărimi, semn important pentru recunoașterea acestor celule. În alte cazuri citoplasma este mai închisă la culoare și cu marginea net delimitată.

Un semn important pentru recunoașterea celulelor reticulare este aspectul cromozomilor în timpul mitozei : ei sînt lungi, subțiri și cu unghiul ascuțit.

În măduvă se întîlnesc următoarele tipuri de celule reticulare :

Celulele reticulare limfoide din măduvă au în general o semnificație funcțională similară cu aceea a histiocitelor din restul mezenchimului.

Se pot distinge două forme de celule reticulare limfoide : celula reticulară limfoidă mică și celula reticulară limfoidă mare.

a) *Celula reticulară limfoidă mică,* după Rohr, este probabil forma de repaus a acestor celule medulare.

Din punct de vedere morfologic și dimensional, celula reticulară mică seamănă cu limfocitul. Se poate deosebi morfologic de acesta datorită anumitor particularități : de cele mai deseori este alungită, piriformă, cu două prelungiri diametral opuse ale citoplasmei, uneori cu o singură prelungire, avînd aspectul de pară. Nucleul poate fi rotund sau alungit în sensul axului mare al celulei. Dimensiunile sînt ca cele ale unui limfocit mic. Citoplasma este bazofilă, iar nucleul are cromatină destul de intens colorată, uneori chiar tahicromatică. Numai puține din aceste celule au nucleu cu aspect reticular ; de asemenea, nucleolul nu poate fi observat decît la celulele care au nucleul rotund, sau prin colorații speciale. Citoplasma este redusă, raportul nucleo-citoplasmatic este mare.

Celula limfoidă mică din stroma măduvei hematogene poate fi întîlnită și în sîngele periferic, mai ales în cursul excitațiilor sistemului reticulo-histiocitar. Aceasta este celula pe care Maksimov o considera drept limfocit. Mai tîrziu, Timofeevski, Benevolenskaia și Terentieva au reușit să demonstreze, prin culturi pe țesuturi, pornind din limfocitele sîngelui periferic, că această celulă este generatoarea tuturor celulelor sîngelui, o celulă pluripotentă, un hemohistioblast. Alekseev presupune că printre limfocitele sîngelui periferic sînt și celule reticulare limfoide care au pătruns din mezenchim.

b) *Celula reticulară limfoidă mare* este reprezentantul tipic, clasic, al celulei reticulare și este considerată de Rohr ca o formă activă, mobilă. Celula are 20—25 μ diametru, sau mai mult. Nucleul este rotund, cu rețeaua de cromatină fină și laxă, fără aglomerări mari, mai slab colorată decît a celulei limfoide mici. Conține 2—3 nucleoli net vizibili. Citoplasma este abundentă, palidă-cenușie, cu margini neregulate, pierzîndu-se uneori fără limită. Celula poate fi rotundă sau ovală. Citoplasma poate prezenta uneori granulații azurofile, ca grăunțe fine sau mici bastonașe.

Celula Ferrata este o celulă reticulară mare, care se întîlnește în special în stări regenerative ale măduvei. Morfologic, prezintă un nucleu mare, cu cromatina de aspect buretos ; în citoplasmă se întîlnesc granulații azurofile multiple, groase, în formă de bastonașe. Ferrata a descris această celulă ca un hemohistioblast, atribuție care astăzi nu mai este admisă, majoritatea autorilor considerînd-o ca o celulă reticulară granulată.

Celula reticulară macrofagă. Macrofagul nu reprezintă un anumit tip de celulă, ci o fază funcțională a celulelor sistemului reticulo-histiocitar, caracterizată prin exercitarea funcției de fagocitoză, care poate fi pusă în evidență morfologic.

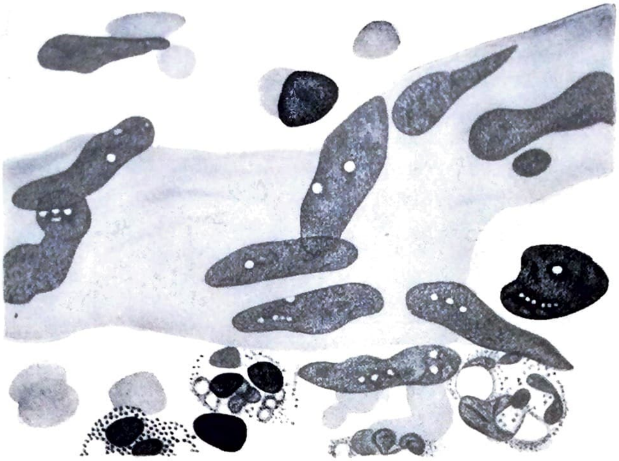


Fig. 180. — Tuberculoză ganglionară. Puncţie ganglionară : celule epitelioide.

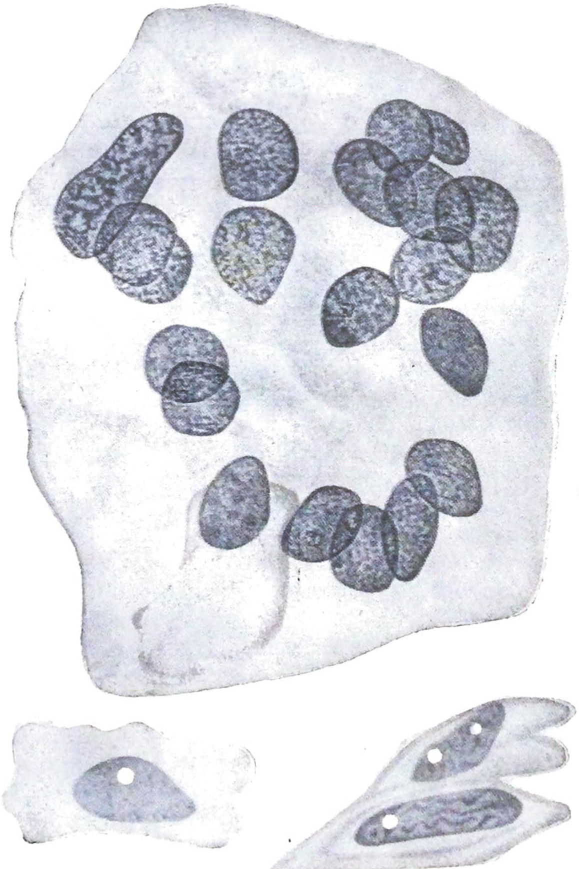


Fig. 181. — Tuberculoză ganglionară. Puncţie ganglionară : celulă gigantă Langhans.

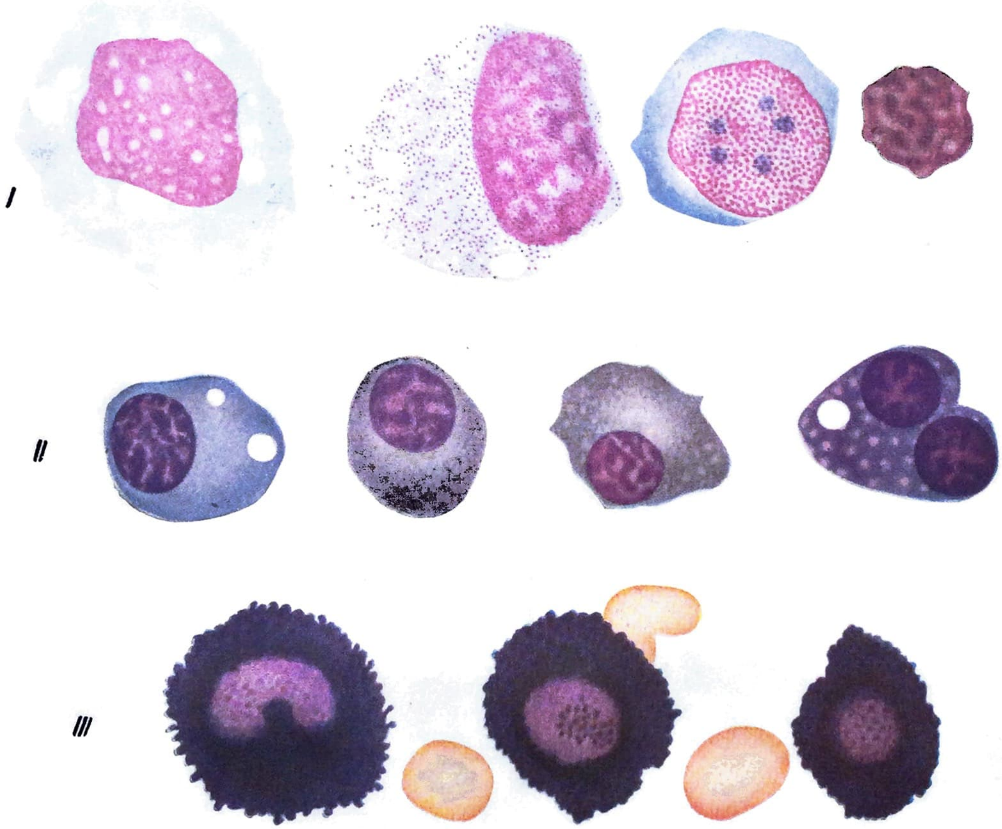


Fig. 182. — Celule reticulare din măduva hematogenă (după Heilmeyer) :
I celule reticulare ; *II* plasmocite ; *III* mastocite.

Este o celulă provenită din mobilizarea elementelor fixe. Nucleul său este oval, fin structurat, citoplasma abundentă, întinsă printre celulele din jur, rău delimitată, colorată foarte palid-cenușiu. În citoplasmă se găsesc particulele fagocitate. Cel mai des aceste incluzii fagocitare sînt resturi eritrocitare sau pigment rezultat din degradarea hemoglobinei (în special în anemii hemolitice). Aspectele de fagocitoză eritrocitară nu trebuie confundate cu suprapunerile întîmplătoare ale celulelor frotiului: chiar în stadiile incipiente ale fagocitozei aspectul eritrocitului este modificat, citoplasma sa luînd o colorație cenușie-verzuie.

În celulele reticulare se pot găsi incluși diverși pigmenți, paraziți ai sîngelui etc.

În tezaurismoze, ca dislipoidozele, celulele reticulare conțin abundente incluzii lipoidice.

Adipocitul este o celulă reticulară cu vacuole mari unice sau multiple, pline cu grăsime, cu nucleul mic și împins la periferie. Această celulă, cu funcție de depozitare dusă la extrem, se întîlnește în mod normal în măduva grasă.

CELULE RETICULARE DIFERENȚIATE

Printre celulele reticulare se întîlnesc unele cu caractere morfologice net deosebite de celelalte celule, descrise mai sus, avînd o evoluție netă spre un anumit tip morfologic și funcțional. Aceste celule reticulare diferențiate sînt reprezentate prin: plasmocit, mastocit și eozinocit.

Plasmocitul. În mod normal, plasmocitul este o celulă de dimensiuni mici, 12—15 μ, de formă ovală, uneori vag triunghiulară. Citoplasma este albastru închis sau violacee, mai intens colorată la periferia celulei. Citoplasma prezintă o caracteristică importantă: un halou mai clar juxtanuclear, care se întinde numai pe o porțiune, fără să cuprindă toată periferia nucleului; ea reprezintă arhoplasma. În interiorul citoplasmei intens bazofile se văd porțiuni mici incolore, precum și vacuole de diferite dimensiuni.

Nucleul plasmocitului, situat totdeauna excentric, este mic, rotund sau ușor oval, cu diametrul mare perpendicular pe diametrul mare al citoplasmei. Structura nucleului se caracterizează prin mase mari de bazicromatină, intens colorate, separate prin șanțuri subțiri de oxicromatină, realizînd aspectul clasic descris «în spițe de roată». Acest aspect nu se întîlnește decît rar pe frotiurile de măduvă, dar este aspectul obișnuit al plasmocitului întîlnit pe secțiunile histologice.

În hiperplaziile medulare pe linie plasmocitară se întîlnesc celule plasmocitare de mărimi și aspecte diferite, care reprezintă formele de trecere între celula reticulară și plasmocit. Aceste forme de trecere sînt denumite celule reticulare de tip plasmatic. Cu cît ele sînt mai aproape de celula de origine, cu atît aspectul nucleului este mai accentuat reticular și citoplasma mai deschisă la culoare. Cu cît celula se maturează, înaintînd spre plasmocit, cu atît structura nucleului devine mai grosolană și citoplasma mai bazofilă. Aceste celule sînt mari, putînd atinge dimensiuni de peste 20 μ (proplasmocite).

La unele celule culoarea violacee a citoplasmei se intensifică spre periferia celulei, devenind roșie-violacee; aceste celule sînt denumite plasmocite flambate (în mielom).

Celula Türk reprezintă plasmocitul găsit în sîngele periferic. Este o celulă rotundă cu citoplasma intens bazofilă, albastră. Nucleul este mai mare, cu structură mai fină, nu este așezat excentric. Haloul perinuclear lipsește sau este puțin vizibil.

Celula Mott este un plasmocit care prezintă o vacuolizare extremă a citoplasmei.

Numărul de plasmocite crește în infecțiile cronice, ca sifilisul, tuberculoza, unele infecții banale.

În rubeolă crește numărul de plasmocite în sîngele periferic (celulele Türk). În rujeolă, scarlatină, varicelă se întîlnește inconstant o plasmocitoză; de asemenea, în hepatita epidemică și în manifestările alergice.

În mielom și în leucemia cu plasmocite se întîlnesc diferite forme patologice ale seriei plasmocitare.

Eozinocitul sau histiocitul eozinofil este o celulă reticulară cu granulații eozinofile. Nucleul este mic și rotund, caracteristic reticular. Citoplasma este plină cu granulații eozinofile tipice, identice cu cele ale granulocitului eozinofil. Citoplasma are limite neregulate, cu prelungiri.

Se deosebește de mielocitul eozinofil prin următoarele caractere: eozinocitul are nucleul mic și intens colorat, raportul nucleo-citoplasmatic mic, iar citoplasma prezintă prelungirile caracteristice. Granulațiile sînt sferoidale, dar de talie variabilă; uneori sînt numeroase, alteori rare, diseminate sau grupate într-o zonă limitată.

Mastocitul, denumit și bazofil tisular sau heparinocit, este o celulă reticulară cu granulații metacromatice, care trebuie diferențiată de granulocitele bazofile. Mastocitele sînt răspîndite în special în capsula hepatică, în derm, în jurul vaselor; se găsesc și în măduva hematogenă, ganglioni, splină.

Este o celulă de 25—30 μ diametru. Nucleul este rotund, dens structurat, uneori cu grămezi mari de cromatină; este situat central, rareori excentric. Talia nucleului este mică: 7—10 μ. Citoplasma prezintă granulații numeroase și voluminoase, metacromatice. Unele celule au citoplasma vacuolizată.

Natura granulațiilor metacromatice ale mastocitului. Cercetările citochimice au arătat că aceste granulații sînt formate de mucopolizaharide, asemănătoare cu acidul condroitinsulfuric. S-a emis astfel ipoteza că granulațiile sînt formate din heparină. Se admite în general că mastocitul secretă heparină (heparinocit).

Aceste granulații prezintă următoarele caractere citochimice: conțin fosfatază alcalină, au o ușoară activitate fosfatazică acidă, nu conțin peroxidaze, nici lipaze, reacțiile pentru glicogen și grăsimi sînt negative.

Numărul de mastocite crește în: agranulocitoze, panmieloftizii, leucoze, metastaze osoase. Numărul lor crește și în bolile alergice, în anemiile hemolitice, în anemiile aplastice. Hiperplazia de mastocite este foarte marcată în urticaria pigmentară și în mastocitom.

FUNCȚIILE SISTEMULUI RETICULO-HISTIOCITAR (S.R.H.)

Funcțiile metabolice și de depozit. Proprietatea esențială a majorității componentelor sistemului reticulo-histiocitar, aceea care a permis strîngerea celulelor disparate într-un tot funcțional unitar, este facultatea de a îngloba în citoplasmă, în anumite condiții, particule mai mari sau mai mici din substanțele cu care vin în contact.

Dacă particulele sînt microscopic vizibile se vorbește de *fagocitoză*: bacterii, fragmente de celule, nuclei sau chiar eritrocite.

Acumularea de granulații coloidale ultramicroscopice a fost denumită *ultrafagocitoză*, *coloidopexie* (fixarea de coloizi), *granulopexie* sau *atrocitoză*.

Proprietatea specifică S.R.H. este coloidopexia, fagocitoza aparținînd, atît S.R.H., cît și altor elemente mezenchimale (granulocite).

Proprietatea de a acumula, ca și aceea de a păstra un anumit timp granulele fixate duce, în cazul injecțiilor masive și repetate de coloizi electronegativi, la fenomenul numit blocare. Depozitarea unor molecule mari, care provin din perfuzarea unor substituenți de masă plasmatică, ca guma acacia, polivinilpirolidon, unii dextrani cu moleculă mare, poate produce tulburări ale funcțiilor sistemului reticulo-histiocitar.

S-a demonstrat că depozitarea se face mai ales pentru moleculele cu greutatea moleculară mare, depășind 80 000—100 000.

În mod obișnuit se găsesc în celulele reticulare ale ganglionilor hilului pulmonar pulberi inerte de cărbune, a căror depunere masivă constituie antracoza, sau pulberea de piatră care dă silicoza, pulberi de metale etc.

Un alt exemplu este dat de macrofagele splinei, care înglobează și distrug în special eritrocite, ceea ce constituie primul fenomen din metabolismul fierului și al pigmenților biliari.

Celulele S.R.H. fixează și moleculele de hemoglobină pusă în libertate în circulație și duc la formarea bilirubinei indirecte.

Exemple de fagocitoză se găsesc și în malarie; se constată o hemoliză accentuată și hemocromatoză. Sub acțiunea parazitului, hemoglobina se transformă în hemomelanină. La dezagregarea eritrocitului, pigmentul rămîne liber în plasmă, de unde se depozitează în întreg S.R.H., organele căpătînd o culoare cenușie.

Tulburările funcțiilor metabolice și de depozit ale S.R.H. duc la manifestări patologice care intră în cadrul tezaurismozelor, printre care cele care interesează în special organele hematopoetice sînt dislipoidozele: boala Gaucher, boala Niemann-Pick, boala Hand-Schüller-Christian.

Funcțiile secretoare. Celulele sistemului reticulo-histiocitar îndeplinesc o funcție secretoare importantă în menținerea echilibrului umoral. Proteinele serice și factorii de coagulare sînt sintetizați și eliberați de acest sistem.

Această funcție asigură producerea de globuline anticorpi, îndeplinind un rol important în fenomenele de apărare umorală a organismului. Celulele specializate în producerea de anticorpi sînt plasmocitele. Limfocitelor și monocitelor din sîngele circulant li se atribuie de asemenea proprietatea de a produce anticorpi.

Sinteza proteinelor fiind legată de S.R.H., testele de disproteinemie reflectă în realitate starea acestui sistem.

Dintre factorii coagulării, protrombina şi mai ales proconvertina şi fibrinogenul sînt sintetizaţi în mod predominant la nivelul ficatului şi în mai mică măsură în sistemul reticulo-histiocitar din întregul organism. Restul factorilor de coagulare provine în mod uniform din întreg S.R.H.

Se admite că serum-albuminele şi α-globulinele sînt sintetizate exclusiv în ficat. De asemenea, în stare patologică macroglobulinele, crioglobulinele, substanţa amiloidă, proteina Bence-Jones sînt elaborate la nivelul S.R.H.

Mastocitului i se atribuie un rol în producerea heparinei. Pornind de la constatarea unei hiperactivităţi funcţionale care urmează după blocarea S.R.H., Moldovanu a reuşit să pună în evidenţă în serul cailor cu S.R.H. blocat cu tuş de China prezenţa unei alte substanţe de secreţie, cu acţiune desensibilizantă, în sindroamele alergice, reticulina M.

Funcţia fibriloformatoare este reprezentată prin producerea de fibre de reticulină de către celulele reticulare. În stări patologice, cu evoluţie sclerogenă, reticulina suferă un proces de transformare colagenă.

Funcţia hematopoetică. Dintre multiplele teorii asupra hematopoezei, teoria unicistă — elaborată de Obrazţov, Maksimov, Kriukov — este cea admisă de majoritatea cercetătorilor. După această teorie, toate celulele sanguine derivă, după multiple transformări, din una şi aceeaşi celulă reticulară a mezenchimului, care constituie baza tisulară a organelor hematopoetice.

După Maksimov, originea tuturor celulelor sîngelui este în limfocitul tisular, celulă pluripotentă care se găseşte în S.R.H. şi se transformă în raport cu condiţiile de mediu. Aceasta este teoria unicismului absolut al lui Maksimov.

Kriukov a arătat, cu mijloace mai perfecţionate de cercetare, că ceea ce Maksimov lua drept limfocit era în realitate un element nediferenţiat, asemănător numai cu limfocitul, denumit de Pappenheim limfoidocit; ulterior a primit denumirea de hemocitoblast. Hemocitoblastul se caracterizează morfologic printr-o structură particulară a nucleului, care este format dintr-o reţea fină de cromatină, cu unul sau mai mulţi nucleoli.

După Kriukov, hemocitoblastul reprezintă celula primordială din care se dezvoltă, în funcţie de condiţiile de mediu, toate celulele sanguine.

Timofeevski, Benevolenskaia şi Terentieva au reuşit prin culturi de ţesuturi să dovedească că celula generatoare a tuturor celulelor sîngelui este celula reticulară limfoidă, considerată ca hemocitoblast.

Celulele reticulare limfoide din măduva hematogenă au în general o semnificaţie funcţională similară cu aceea a histiocitelor din restul mezenchimului. Celula reticulară limfoidă mică este considerată de Rohr ca forma de repaus a celulelor reticulare limfoide medulare, echivalînd cu ceea ce se numeşte hemohistioblast. Celula reticulară limfoidă mare este celula mobilizată pluripotentă care echivalează cu hemocitoblastul.

Conform concepţiei uniciste, una şi aceeaşi celulă reticulară este capabilă să se transforme şi să evolueze în diferite direcţii (pluripotenţă), fapt foarte important pentru înţelegerea esenţei metaplaziei leucemice.

Spre deosebire de partizanii unicismului absolut al lui Maksimov, adepţii lui Kriukov, al unicismului moderat, admiţînd unitatea originii tuturor celulelor sîngelui din una şi aceeaşi celulă primordială, admit în acelaşi timp existenţa a două sisteme pentru seria albă: mieloid şi limfoid.

Independenţa celor două sisteme, mieloid şi limfoid, după unicismul moderat, se dovedeşte în clinică prin existenţa a două tipuri de leucoze: mieloidă şi limfoidă.

În realitate, toate şcolile hematologice actuale, cea dualistă (Naegeli), cea trialistă (Aschoff), ajung în cele din urmă tot la concluzia că la originea tuturor elementelor figurate ale sîngelui se găseşte o aceeaşi celulă primordială, celula mezenchimatoasă reticulo-histiocitară, hemohistioblastul. Dovezi în sprijinul acestei ipoteze sînt date de culturile de ţesuturi, în care limfocitele sîngelui periferic pot da naştere la toate seriile celulare. Alekseev presupune că aceste celule nu sînt decît celulele reticulare limfoide, care au pătruns din mezenchim în sînge.

AFECŢIUNILE SISTEMULUI RETICULO-HISTIOCITAR

Clasificare

Reticulozele inflamatoare (*reticulite*) *sau reticuloze proliferative*. În această grupă intră afecţiunile în care agentul patogen infecţios, parazitar sau de altă natură provoacă apariţia unei reacţii a sistemului reticulo-histiocitar.

Reticulozele inflamatoare sau reticulitele sînt denumite de unii autori și reticuloze proliferative. Pot fi acute și cronice.

Printre reticulozele inflamatoare acute se numără: febra tifoidă, tifosul exantematic, endocardita lentă, reumatismul articular acut, malaria, kala-azarul, tripanosomiaza etc.

Cele cronice se întîlnesc în cursul unor inflamații sau iritații prelungite ale S.R.H., care reacționează prin proliferare, hipertrofie și hiperfagocitoză la început, iar apoi prin scleroză și fibroză. Survin în malaria cronică, în unele forme de kala-azar, în sifilis, în tuberculoza cronică, în sindromul Banti, în limfogranulomatoza benignă Besnier-Boeck-Schaumann.

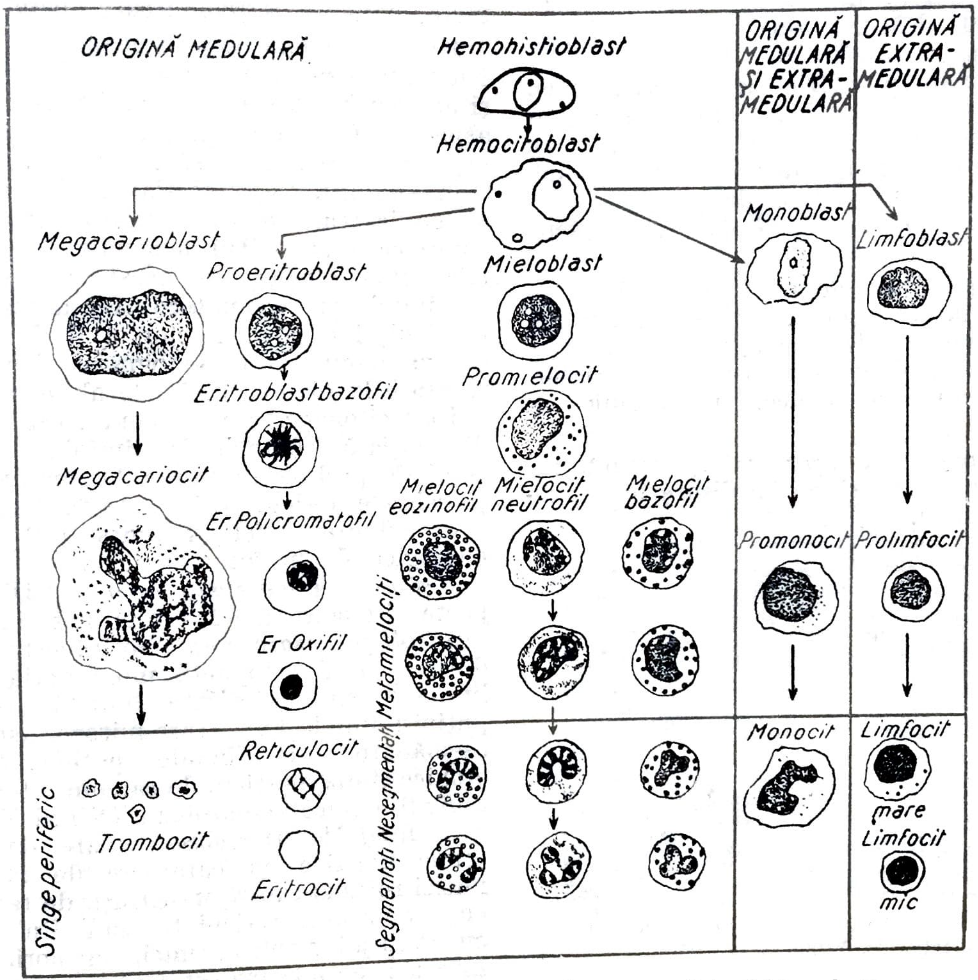

ORIGINĂ MEDULARĂ
Hemohistioblast
Hemocitoblast
ORIGINĂ MEDULARĂ ȘI EXTRA-MEDULARĂ
ORIGINĂ EXTRA-MEDULARĂ
Megacarioblast
Proeritroblast
Mieloblast
Monoblast
Limfoblast
Eritroblast bazofil
Promielocit
Megacariocit
Mielocit eozinofil
Mielocit neutrofil
Mielocit bazofil
Er. Policromatofil
Promonocit
Prolimfocit
Er Oxifil
Metamielocit
Reticulocit
Monocit
Limfocit
mare
Limfocit
mic
Trombocit
Eritrocit
Segmentați Nesegmentați
Sînge periferic

Fig. 183. — Evoluție normală a celulelor conform concepției unicist-moderate.

Reticuloze acumulative (*tezaurismoze*). Din această grupă, cele care interesează hematologia sînt dislipoidozele:

— Boala Gaucher
— Boala Niemann-Pick
— Boala Hand-Schüller-Christian.

Reticulozele neoplazice (*hiperplazice-tumorale*) sînt:

— Leucozele
— Tumorile sistemului reticulo-histiocitar
— Sarcoleucozele
— Reticulozele histiocitare (reticuloza histio-monocitară Cazal)
— Reticulo-endotelioze (Letterer-Siwe și Lupu-Brauner).

RETICULOZE HIPERPLAZICE TUMORALE. TUMORILE ORGANELOR HEMATOPOETICE

LIMFOSARCOAMELE

Limfosarcoamele sînt tumori maligne, localizate sau generalizate, care se dezvoltă în sectorul limfoid al S.R.H. : ganglioni, splină, foliculi limfatici; sînt alcătuite din elemente diferențiate — limfocite sau limfoblaști.

Se descriu mai multe forme de limfosarcoame :

a) *Limfosarcomul localizat* la un singur ganglion, zis și solitar (la începutul evoluției), sau interesînd un grup ganglionar sau pluriregional, interesînd mai multe grupe de ganglioni.

b) *Limfosarcomatoza Kundrat* : formă generalizată.

c) *Limfoleucosarcomatoză* : tumoare limfosarcomatoasă, însoțită de trecerea elementelor celulare componente în sîngele circulant (formă citemică). Numărul leucocitelor poate fi variabil ; se descriu forme leucemice, subleucemice și aleucemice.

d) *Leucosarcomatoza tip Sternberg* este o formă limfoleucosarcomatoasă cu localizare în ganglionii mediastinali.

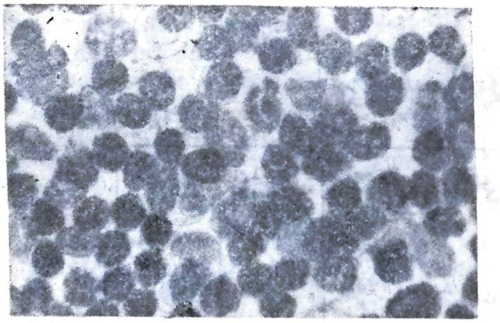


Fig. 184. — Limfosarcom. Puncție ganglionară (colecția dr. Virgil T. Ionescu).

Caractere clinice. Tumoarea prezintă o creștere agresivă, depășind rapid limitele ganglionilor și infiltrînd țesutul periganglionar și organele vecine. Tabloul clinic variază după localizare : mediastin, abdomen, buco-faringe, tub digestiv etc. Splina este normală sau uneori hipertrofiată.

Examenul hematologic poate pune în evidență mai multe variante :

— sînge periferic normal, măduvă normală, anemie care uneori este de tip hemolitic cu autoanticorpi ;

— leucopenie sau leucocitoză pînă la 15 000 și 20 000/mm^3, cu polinucleoză neutrofilă ; eozinofilia este excepțională ;

— limfoleucosarcomatoza se însoțește de modificări sanguine leucemice, subleucemice și aleucemice. În astfel de cazuri se poate întîlni și o metaplazie limfosarcomatoasă medulară.

Evoluția hematologică se poate face diferit. Nu toate formele au același grad de malignitate, și aceeași boală sarcomatoasă poate să îmbrace aspecte diferite de-a lungul evoluției sale. Aceste aspecte diferite interesează, fie morfologia celulelor tumorii, fie evoluția ei anatomo-clinică : generalizarea tumorală limfosarcomatoasă, sau complicare cu saltul leucemic de obicei spre sfîrșitul evoluției, în acest caz vorbindu-se de limfoleucosarcomatoză. De aceea, citodiagnosticul limfosarcoamelor trebuie completat cu examenul clinic, hemograma și mielograma, repetate la diverse perioade ale evoluției bolii.

Deși citologic, limfosarcomul este o tumoare diferențiată (limfocite și limfoblaști), la procesul de proliferare tumorală iau uneori parte și celulele reticulare ale stromei ganglionare.

Se admite astfel existența a 3 posibilități citologice de limfosarcoame.

Puncția ganglionară. Diferitele aspecte citologice ale frotiului pot fi :

a) *Limfocitosarcomul* : frotiul este constituit dintr-o masă compactă monomorfă de celule limfoide, în majoritate limfocite adulte, și puțini limfoblaști, cu rare mitoze. Aspectul este asemănător cu cel din adenopatiile limfoleucozei cronice și diagnosticul de sarcom este dificil fără tabloul clinico-hematologic (Virgil T. Ionescu).

b) *Limfoblastosarcomul* : mare densitate de celule blastice cu caractere de malignitate : nuclei rotunzi sau ușor știrbiți, de talie inegală, cu cromatina reticulată sau fin grunjoasă, cu multipli nucleoli mici, incolori, frecvente mitoze : citoplasma etalată, subțire în jurul nucleului.

De obicei aceste două variante reprezintă momente diferite în evoluția sarcomului sau aspecte diferite la nivelul diferitelor localizări.

c) *Limforeticulosarcomul* : celule tumorale cu polimorfism mult mai accentuat : talie mare, inegală, monstruozități nucleare, nuclei știrbiți, monocitoizi, rar lobulați, cu cromatina fin grunjoasă, cu nucleoli incolori, inegali, citoplasma în lizereu îngust, albăstruie.

Examenul histopatologic arată proliferare intensă celulară, cu ștergerea arhitecturii ganglionare. Celulele patologice invadează sinusurile marginale şi medulare, traversează şi depăşesc capsula ganglionară, invadînd ţesuturile vecine.

d) Limfomul gigantofolicular (boala Brill-Symmers, limfoblastom macrofolicular). Clinic se caracterizează printr-o adenopatie generalizată. Nu există semne clinice grave, evoluţia fiind în general benignă şi întinzîndu-se pe o perioadă de 10—15 ani, sau mai mult.

Puncţia ganglionară şi citologică nu sînt concludente. Examenul histopatologic pune în evidenţă enorma hipertrofie a foliculilor limfatici. În stadiile înaintate, foliculii se contopesc şi aspectul este de reticulosarcom sau limfoblastosarcom.

RETICULOSARCOAMELE

Aceste tumori ale ţesutului reticulohistiocitar se împart în reticulosarcoame nediferenţiate şi reticulosarcoame diferenţiate.

Reticulosarcoamele interesează cel mai des măduva oaselor şi ganglionii limfatici, mai rar splina, amigdalele, foliculii limfatici ai tubului digestiv, ficatul, plămînii.

Reticulosarcoamele ganglionilor limfatici

Puncţia ganglionară. Se pot găsi tablouri citologice variate.

a) *Reticulosarcomul*: aproape toate celulele sînt de tip reticular, cu talie mare, uneori cu polimorfism accentuat, cu nucleoli inegali, incolori sau slab albăstrui; citoplasma formează un lizereu îngust, albăstrui. Limfocitele tipice sînt aproape complet dispărute. Se vorbeşte de reticulosarcomatoză cînd proliferarea tumorală interesează întreg ţesutul limfo-adenoid.

Reticulosarcomul devine în mod excepţional citemic, dar măduva poate prezenta, uneori, o puternică metaplazie reticulară.

b) *Limforeticulosarcomul*: predomină celule de tip limfocitar, însoţite de o proliferare importantă de celule reticulare.

c) *Histioreticulosarcomul* se deosebeşte de reticulosarcom prin forma nucleului şi abundenţa citoplasmei. Nucleii sînt de un polimorfism extraordinar: aşezaţi la un colţ al celulei, în eşarfă, unici, multipli, lobulaţi, frecvent înmuguriţi, monocitoizi, sau amintind, prin monstruozitatea lor, celulele Sternberg; cromatina este vermiculată, reticulată, nucleolii multipli, incolori sau albăstrui, foarte inegali. Citoplasma este mai abundentă decît a celulelor din reticulosarcoamele nediferenţiate. Sînt tumori care pot deveni citemice — reticulemii: apare în sînge un număr anormal de celule tinere, monocitare, asemănătoare celor din leucemia monocitară tip Schilling. Aceste forme constituie reticuloza histiomonocitară tip Cazal.

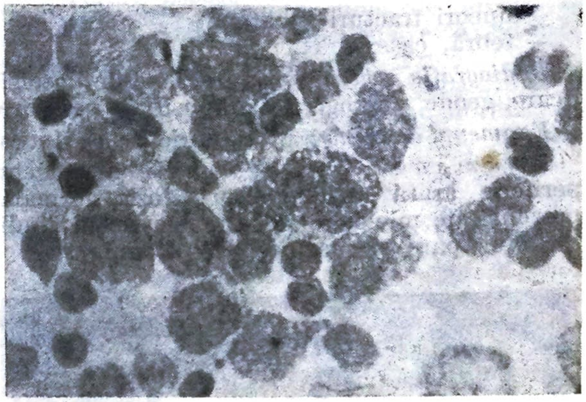


Fig. 185. — Reticulosarcom. Puncţie ganglionară (colecţia dr. Virgil T. Ionescu).

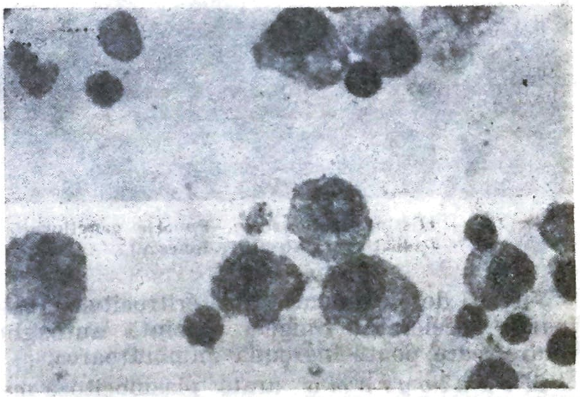


Fig. 186. — Mielom multiplu; puncţie sternală (colecţia dr. Virgil T. Ionescu).

Reticulosarcoamele măduvei oaselor

a) *Reticulosarcoame diferenţiate*

Mielomul multiplu (*plasmocitomul sau boala Rustiţki-Kahler*) este o reticuloză malignă interesînd celulele liniei plasmocitare; este localizat de cele mai deseori la nivelul scheletului, foarte rar extramedular (plasmocitom extramedular).

Simptomatologia clinică constă în :

— dureri osoase (coloana vertebrală, coaste, bazin) ;

— cefalee ;

— deformații : tumoare osoasă (rare) ;

— uneori fracturi spontane ;

— febră, cașexie.

Radiografia scheletului arată zone de decalcificare, geode, microgeode, prăbușiri de vertebre.

Examenul de urină : proteinurie Bence-Jones.

Examenul hematologic al sîngelui periferic arată anemie, leucocitoză normală, prezență de mielocite și normoblaști ; în stadii tardive apare și plasmocitoză sanguină.

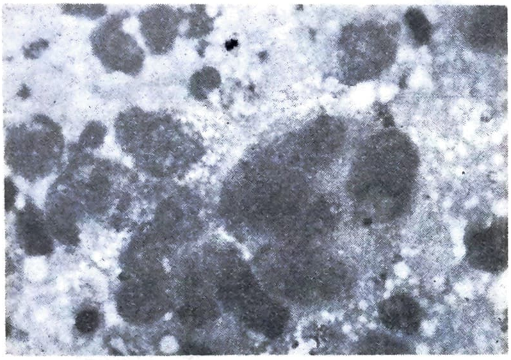


Fig. 187. — Histioreticulosarcom. Puncție ganglionară (colecția dr. Virgil T. Ionescu).

Viteza de sedimentare a eritrocitelor este foarte accelerată. Sîngele prezintă autoaglutinare, care poate îngreuna numărătoarea.

Medulograma arată plasmocitoză medulară, atît în formele focale multiple, cît și în cele difuze.

Ganglionii, splina și ficatul sînt în general normale.

Aspectul citologic al produsului de puncție a osului. Radiografia oaselor și în special a calotei craniene arată prezența de geode caracteristice, dar aceste imagini se întîlnesc și în alte afecțiuni : mai frecvent în metastaze canceroase.

Puncția unei geode tranșează definitiv diagnosticul : frotiul apare alcătuit aproape exclusiv din celule de tip plasmocitar în diferite stadii de evoluție, prezentînd o mare varietate morfologică. Se întîlnesc plasmocite adulte și plasmocite imature, precum și toate formele de trecere de la celula reticulară pînă la plasmocitul adult : celule reticulare de tip plasmatic, plasmoblaști, plasmocite.

Din punct de vedere strict morfologic, deosebirea între o reacție plasmocitară intensă (ca cele ce se întîlnesc în infecții) și mielom poate fi dificilă. În mielom există însă modificări citologice caracteristice : plasmoblaști cu nucleoli mari, anizoplasmocitoză, forme de trecere de la celula reticulară la plasmocit. Majoritatea celulelor prezintă un raport nucleo-citoplasmatic mare. Citoplasma prezintă o afinitate tinctorială diferită de la o celulă la alta, în funcție de stadiul de evoluție : violet închis, uneori violet roșcat (plasmocit flambat), mai ales marginile protoplasmei. Deseori se întîlnesc vacuole. Cu cît formele celulare tinere sînt mai numeroase, cu atît evoluția este mai rapidă, mai gravă.

Date electroforetice și imunoelectroforetice

Studiul proteinelor plasmatice arată prezența unei protidemii ridicate mergînd pînă la 12–14 g%, relativ des întîlnită și însoțită de hiperglobulinemie.

După mobilitatea electroforetică a anomaliei proteice se disting mieloame de tip γ, β, și foarte rare α_2. Electroforeza pe hîrtie prezintă o bandă îngustă și intensă, iar înscrierea curbei arată un vîrf îngust, ascuțit și foarte înalt care corespunde fracțiunii patologice.

Se întîlnesc însă mieloame cu o electroforeză a serului normală sau cu modificări minime ce nu se încadrează electroforetic în disglobulinemiile mari. Aceste tipuri de mieloame s-au dovedit a fi mieloame de tip Bence-Jones după clasificarea imunoelectroforetică.

Nomenclatura electroforetică de α-, β- și γ-globuline nu reprezintă entități proteice pure, ci zone de migrare a numeroase fracțiuni serice. Clasificarea mieloamelor, bazată pe mobilitatea electroforetică a paraproteinei, a dus la o concepție greșită deoarece fiecare fracțiune electroforetică este reprezentată de către mai multe proteine diferite fără să se precizeze natura paraproteinei.

Prin studiul imunoelectroforetic s-a demonstrat că proteine cu structură imunochimică ca aceea a γ-globulinelor se pot găsi, atît în zonele de migrare γ, cît și în zonele de migrare β și α_2. De asemenea, proteina Bence-Jones, care se pune în evidență numai imunoelectroforetic, se găsește cel mai frecvent în regiunea β_2, dar poate fi găsită și în regiunea α_2.

Studiul imunochimic a arătat că mielomul de tip β (electroforetic) poate fi format de γ-globulină rapidă sau de β_{2A}-globulină. De asemenea, mielomul de tip α_2 (electroforetic) este format de β_{2A}-globulină.

Clasificarea mieloamelor, admisă în prezent, este cea imunoelectroforetică, care arată natura reală a paraproteinei respective. Această clasificare admite 3 tipuri de mieloame: γ-mielom, β_{2A}-mielom și mielom cu proteină Bence-Jones.

1. Mieloame cu paraproteină de tip γ (fig. 188).

Arcul de precipitare imunoelectroforetică dispare dacă antiserul polivalent este adsorbit cu γ-globulină. Conținutul în glucide totale a fracțiunei γ este de 2,5%, deci identic cu al γ-globulinei normale. Testul Kunkel (SO_4Zn) este intens pozitiv în 70% din cazuri de mielom γ.

2. Mieloame cu paraproteină de tip β_{2A} (fig. 188).

Arcul de precipitare imunoelectroforetic al paraproteinei β_{2A} se situează în afara arcului dat de γ-globulină. Acest arc dispare dacă antiserul polivalent este adsorbit cu β_{2A}-globulină. Fracțiunea β_{2A} se deosebește de γ prin bogăția în glucide totale (10,6%). Testul Kunkel (SO_4Zn) dă valori normale în 70% din cazuri de mielom β_{2A}, particularitate remarcabilă, care, alături de celelalte date, pune diagnosticul de mielom tip β_{2A}.

3. Mieloame cu paraproteină de tip Bence-Jones (fig. 188).

Paraproteina Bence-Jones poate însoți mieloamele de tip γ și mieloamele de tip β_{2A}.

Există și mieloame numai cu paraproteină de tip Bence-Jones, care prezintă un aspect normal la electroforeză. În prezent, vechea definiție a proteinei Bence-Jones a fost abandonată. Caracterul discriminativ de a precipita la 56° și de a se redizolva la fierbere este considerat ca un caracter excepțional și accesoriu. Autorii contemporani definesc proteina Bence-Jones prin noțiunile imunochimice, avînd o înrudire antigenică parțială cu γ-globulinele și o greutate moleculară mai mică decît a γ-globulinelor. Imaginile imunoelectroforetice ale proteinei Bence-Jones arată o linie subțire de precipitare în regiunea β_2-γ, situată aproape de jgheabul anticorpilor. Difuziunea ușoară se datorește moleculelor mici. Această linie subțire se unește cu linia γ-globulinelor, demonstrînd, astfel, o reacție de identitate parțială între cele două proteine.

Linia dispare dacă antiserul polivalent este adsorbit cu γ-globulină sau β_{2A}-globulină, ceea ce dovedește că paraproteina Bence-Jones este, în mod exclusiv, formată din determinanți antigenici comuni celor două globuline normale γ și β_{2A}. De asemenea, linia de precipitare dispare dacă serul polivalent este adsorbit cu paraproteina izolată din urină.

Mieloamele de tip Bence-Jones prezintă la electroforeza pe hîrtie un aspect normal sau aproape normal. Glucidele totale sînt normale ca și în mielomul γ, testul Kunkel dă în 70% din cazuri valori normale, uneori și valori intens pozitive.

Forme de plasmocitom. Afecțiunea se poate prezenta sub următoarele aspecte:

1. Plasmocitom multiplu: forma obișnuită, caracterizată prin focare osoase multiple, interesînd, în ordinea frecvenței, vertebrele și coastele, apoi sternul și calota craniană etc.
2. Plasmocitomul difuz: leziuni difuze, generalizate. Se întîlnește mai rar.
3. Plasmocitomul solitar: localizat într-un focar osos unic, uneori în țesuturi extramedulare (ganglioni, amigdale). Această formă este excepțională.
4. Leucoză cu plasmocite: excepțional de rară, interesează măduva (leziuni difuze), splina, ganglionii și sîngele periferic.

Evoluția este rapidă, ducînd la deces în 6 luni. Formele cu evoluție mai lentă de 2–3–6 ani sînt mai rare.

Diagnostic diferențial. Aspectul radiologic de geode circulare în oase se poate întîlni în metastazele osoase carcinomatoase: cancerul de prostată, al glandei mamare, al tiroidei. De asemenea, aspecte asemănătoare se pot constata în reticulosarcomatoza osoasă și în dislipoidoze, în modificările osoase tumorale: reticulosarcom Ewing sau Parker-Jackson, boala Hodgkin cu localizare osoasă. Decalcificări în arii multiple se pot observa în osteoporoza senilă. Diagnosticul se face pe baza prezenței plasmocitelor în puncția osoasă. Pentru diagnosticul diferențial cu alte paraproteinemii: a se vedea macroglobulinemiile.

b) *Reticulosarcoame nediferențiate*

Reticulosarcomul Ewing se întîlnește la tineri și la copii, spre deosebire de celelalte osteosarcoame, care se întîlnesc mai frecvent la adulți.

Examenul citologic (Virgil T. Ionescu) arată prezența unei mari cantități de celule de dimensiuni mici, de talie aproape egală; nucleul are cromatină fin reticulată sau fin grunjoasă și conține

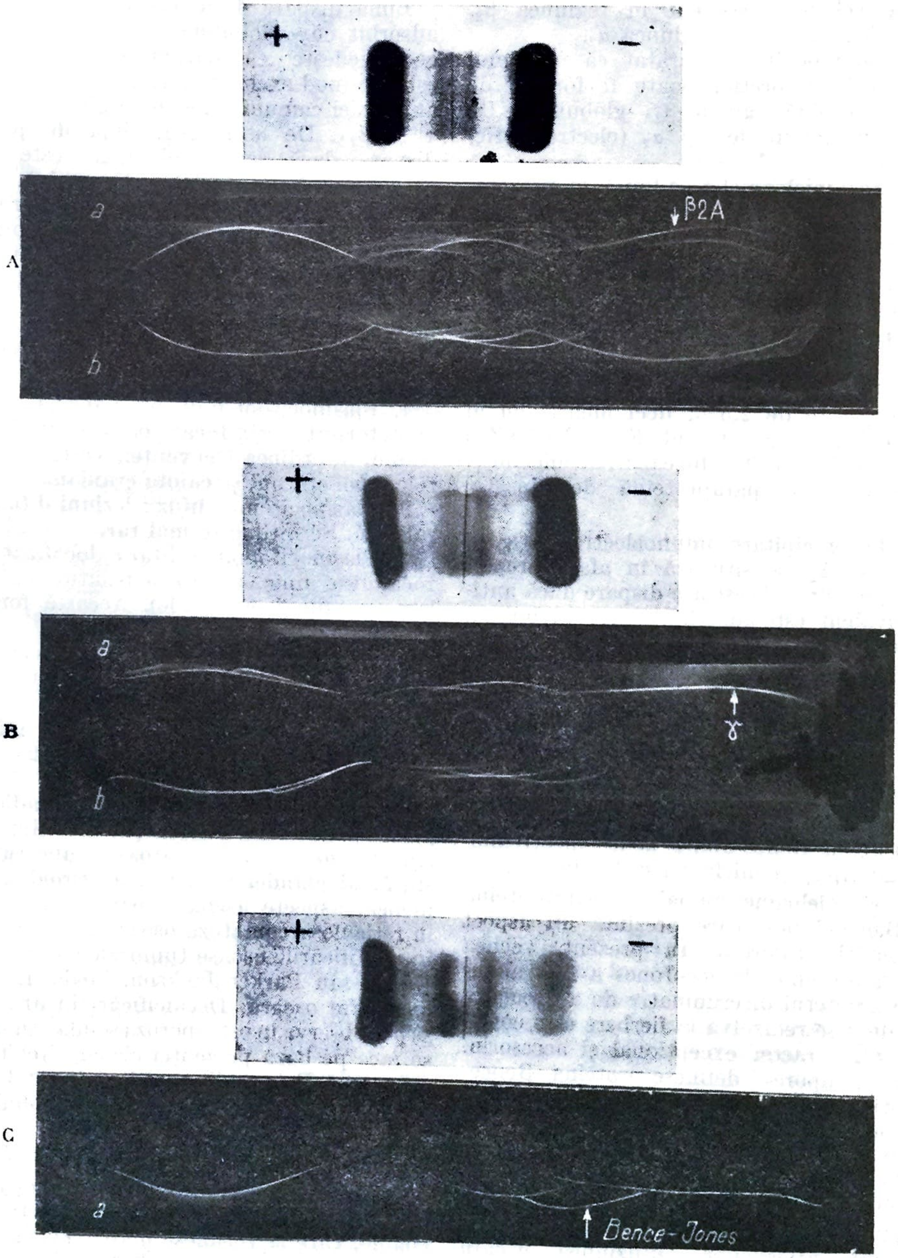

+
−
a
β2A
b
A
+
−
a
γ
B
b
+
−
C
a
Bence-Jones

Fig. 188. — Electroforeză și imunoelectroforeză în :

A – mielom β_2 ; *B* – mielom γ ; *C* – mielom Bence-Jones.

a – Ser antiproteină umană polivalent.

b – Ser antiproteină umană absorbit cu γ-globulină.

nucleoli multipli mici şi incolori; citoplasma este bazofilă, puţin abundentă, uneori cu contur imprecis. Tumoarea corespunde unei proliferări a celulelor reticulare foarte tinere, nediferenţiate; pe secţiunile histologice este caracterizată prin absenţa fibrelor reticulare argentafine.

Reticulosarcom tip Parker-Jackson (Virgil T. Ionescu). Celulele tumorale frapează prin dimensiunile lor mari, nucleul globulos, monocitoid sau dispus transversal, cu cromatina neregulat condensată şi nucleolii inegali, cu citoplasma abundentă, slab albăstruie. Pe secţiuni histologice tumoarea apare bogată în fibre de reticulină, care înconjură fiecare celulă sau grupuri mici de celule.

Diagnosticul diferenţial al acestor două tipuri are o importanţă deosebită, între ele existînd o mare deosebire clinică şi prognostică. Tipul Ewing evoluează rapid şi dă metastaze precoce scheletice şi pulmonare, pe cînd tipul Parker Jackson evoluează mult mai lent, uneori ani-

RETICULOZE GRANULOMATOASE

Limfogranulomatoza malignă

(Boala Hodgkin-Paltauf-Sternberg)

Aspect clinic. Adenopatia este semnul major şi cel mai constant. Cea mai frecventă este localizarea cervicală, unilaterală. Ganglionii sînt bine delimitaţi, mobili, nedureroşi. Alte localizări frecvente sînt cele axilare şi cele mediastinale. Se întîlnesc forme cervico-mediastinale, axilo-mediastinale. Formele retroperitoneale sînt rare.

În timpul evoluţiei bolii se observă extinderea adenopatiei de la un grup ganglionar la altul.

Splenomegalia este frecvent întîlnită, dar nu constantă; este o splenomegalie moderată, nedureroasă.

Febra reprezintă un semn foarte frecvent; ia aspect de febră recurentă, sau alte forme.

Pruritul este intens, rebel la tratamentele locale.

Localizările osoase cele mai frecvente sînt cele vertebrale, apoi cele sternale.

Formele pleuro-pulmonare pot lua aspect de pleurezie, de localizări pulmonare nodulare multiple, de infiltrat localizat, uneori cu caracter tumoral sau de excavaţie.

Examenul hematologic al sîngelui periferic arată:

— Anemia este relativ rară şi moderată; apare tardiv, în formele mai evoluate.

— Leucocitele sînt crescute în 80% din cazuri, cu polinucleoză neutrofilă. Eozinofilia se întîlneşte în 48% din cazuri, limfopenia în 61%. Monocitele se găsesc crescute în 80% din cazuri; trombocitele sînt crescute în 50% din cazuri.

— V.S.H. este accelerată.

— Mielograma sau splenograma nu arată cel mai adesea nimic deosebit, întrucît cu totul excepţional se întîmplă ca puncţia să nimerească un nodul granulomatos.

Puncţia ganglionară. Examenul citologic al produsului de puncţie ganglionară pune diagnosticul în peste 90% din cazuri.

Adenograma prezintă două caracteristici: prezenţa celulelor Sternberg şi polimorfia celulară.

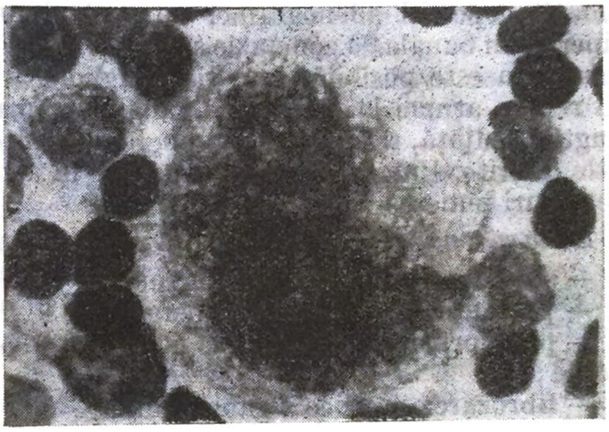


Fig. 189. — Limfogranulomatoză malignă (boala Hodgkin). Puncţie ganglionară: celulă Sternberg (colecţia dr. Virgil T. Ionescu).

Celulele Sternberg sînt celule de dimensiuni foarte mari, cu diametrul variind între 30 şi 100 μ, cu 2 sau 3 nuclei mari cu cromatina densă, nuclei care se suprapun, dînd un aspect monstruos de nucleu înmugurit. Caracteristică este prezenţa de nucleoli monstruoşi, cu dimensiuni pînă la 10 μ şi mai mult, coloraţi în albastru închis sau violet. Protoplasma este albastru-închis sau, la celulele mai mari, albastru-deschis, spre cenuşiu. Uneori celulele de talie mare au limitele protoplasmei neregulate şi vacuole multiple. Se mai pot întîlni nuclei liberi lipsiţi de protoplasmă (strivirea celulei prin întinderea frotiului).

Celulele de granulom. Pe lîngă celulele Sternberg, caracteristice, contextul lamei este foarte important, datorită prezenţei unui polimorfism celular, constituit din celule normale, caracteristic granuloamelor. Se întîlnesc limfocite mature, limfoblaşti, granulocite neutrofile, frecvente eozinofile, plasmocite, celule reticulare normale.

Pe lîngă aspectul caracteristic descris, care nu dă naştere la nici o confuzie, se pot întîlni şi alte aspecte, mai puţin caracteristice. Astfel, se întîlnesc la examenul adenogramei celule mari, dar mononucleate, a căror structură şi afinitate tinctorială a protoplasmei, nucleului şi nucleolului se aseamănă cu ale celulei Sternberg. Astfel de celule au fost denumite de unii autori celule presternbergoide sau, cum le denumesc Heilmeyer şi Moeschlin, „celulele Hodgkin''. Aceste celule, cu un singur nucleu, se aseamănă mult cu celulele reticulare mari, care se găsesc într-o iritaţie cu hiperplazie simplă, încît în absenţa celulelor Sternberg diagnosticul poate fi dificil.

Cu cît boala este mai la începutul evoluţiei, cu atît aspectul adenogramei este cel al unei hiperplazii banale. O concluzie sigură în astfel de cazuri nu este posibilă. Puncţia ganglionară se va repeta atunci la mai mulţi ganglioni, într-o singură şedinţă, sau la acelaşi ganglion, la intervale diferite. Puncţiile repetate permit în astfel de cazuri punerea diagnosticului.

Examenul histopatologic arată:

— ştergerea arhitecturii ganglionare;

— prezenţa de celule Sternberg;

— polimorfismul celular, cu numeroase eozinofile;

— fibrozarea precoce a ganglionului.

LIMFOGRANULOMATOZA BENIGNĂ
(Boala Besnier-Boeck-Schaumann)

Tabloul clinic cuprinde:

— Leziunile cutanate foarte polimorfe, de obicei nodulare, mici sau mari, cu aspect de grăunţi galbeni sau translucizi la vitropresiune.

— Adenopatii în 80—90% din cazuri, cu ganglioni de mărime moderată, duri, mobili, nedureroşi. Un caracter important este simetria lor. Localizările obişnuite sînt: axilară, inghinală, mediastinală.

— Leziunile pulmonare sînt frecvent întîlnite.

— Splenomegalia este frecventă şi poate fi însoţită de un sindrom hematologic de hipersplenism.

— Leziunile osoase sînt localizate la nivelul degetelor (tumefacţia falangelor). Radiologic, se constată un aspect grilat al structurii osoase (osteită chistică).

— Se mai pot găsi: iridociclită, hipertrofia parotidelor.

Examenul hematologic arată în sîngele periferic, inconstant, o mononucleoză, uneori eozinofilie.

Măduva este normală.

Hiperproteinemia prin creşterea globulinelor se observă frecvent. Uneori există hipercalcemie.

Adenograma. Aspectul citologic se caracterizează prin prezenţa de numeroase celule epitelioide. Acestea sînt elemente alungite, ovale sau uşor efilate, cu lungime de 20—35 μ. Protoplasma, cînd este vizibilă, este abundentă, cu coloraţie albastră-palidă sau cenuşie. Nucleii sînt ovalari, de 14—20μ lungime, cu structură cromatiniană laxă, cu aspect reticular fin; prezintă unul sau mai mulţi nucleoli albastru-deschis. Celulele gigante de tip Langhans sînt rare.

Histopatologic se pun în evidenţă noduli formaţi din mase de celule epitelioide, înconjurate de o coroană subţire de limfocite, printre care se găsesc fibre reticulinice. Nodulii din sarcoidoză sînt delimitaţi, izolaţi şi nu confluează ca cei din tuberculoză. În centrul nodulului se pot întîlni celule Langhans. Lipseşte necroza şi cazeificarea, lipseşte calcificarea, nu se găsesc bacili Koch.

În punerea diagnosticului ajută mult intradermoreacţia la tuberculină, care în sarcoidoză este în general negativă.

Intradermoreacţia Kveim (produs triturat de ţesut sarcoidic) este pozitivă. Citirea se face după 2—4 săptămîni, cînd apare un nodul violaceu, a cărei structură histologică este asemănătoare cu a nodulului sarcoid.

Diagnosticul diferenţial trebuie făcut cu lupusul tuberculos, cu sifilisul terţiar, cu lepra şi cu toate tipurile de adenopatii, iar în formele cu leziuni pulmonare — cu granulia rece, fibrozele pulmonare, pneumoconiozele.

Evoluţia este lentă, benignă.

RETICULOZE ACUMULATIVE (TEZAURISMOZE)

Dislipoidozele sînt stări morbide familiale, în care substanţe din grupa lipidelor se acumulează în cantitate mare în organism.

BOALA GAUCHER

a) Se caracterizează prin acumularea de cerebrozide de tipul cerazinei în celulele reticulare ale organelor hematopoetice.

Boala este sigur familială şi de obicei debutează în a doua copilărie, rar la nou-născut. La adult se poate constata o coloraţie galben-brun caracteristică a pielii.

Din punct de vedere *hematologic* se observă anemie hipocromă, care apare tardiv, leucopenie și trombopenie.

Măduva hematogenă arată o inhibiție exercitată de o splină hiperactivă. Se întîlnesc celule Gaucher.

Splenomegalia este enormă, ficatul variabil mărit de volum. Se poate întîlni o adenopatie difuză, dar inconstant.

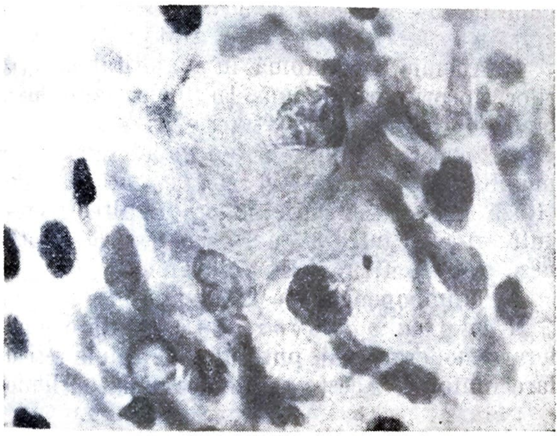


Fig. 190. — Boala Gaucher. Amprentă splenică : celule Gaucher.

Puncția splenică sau *hepatică* și deseori și cea sternală arată prezența *celulelor Gaucher*, celule mari cu diametrul pînă la 60 μ. Nucleul este mic, central sau ușor excentric, de aspect reticular, uneori picnotic; se întîlnesc și celule cu nuclei multipli. Citoplasma abundentă, albastră-cenușie, conține formațiuni aciculare, lamelare, uneori dispuse concentric, sau filamentoase, dînd citoplasmei un aspect «pieptănat». Se mai descriu celule Gaucher cu citoplasmă fin vacuolată, spumoasă.

Evoluția este lentă, de 5 – 10 ani sau mai mult. Cînd boala debutează la vîrsta de sugar, evoluția este rapidă.

BOALA NIEMANN-PICK

Se caracterizează prin acumularea de fosfodiaminolipoizi, și anume de sfingomielină, în organe, mai ales ficat și splină, dar și în creier etc. Boala este familială și debutul clinic survine în primul an de viață.

Examenul hematologic arată anemie și leucopenie.

Splenomegalia este voluminoasă. Există de asemenea hepatomegalie și adenomegalie.

Puncția splenică pune în evidență *celulele Pick*: elemente mari, de 20 — 60 μ diametru, cu citoplasmă de aspect spumos, datorită prezenței incluziilor de aspect clar; nucleul este mic, ușor excentric.

Evoluția este rapid fatală, în cîteva luni.

BOALA HAND-SCHÜLLER-CHRISTIAN

Se caracterizează prin acumulare de colesterol în celulele hiperplaziate ale sistemului reticulo-histiocitar subperiostal, cu invadare a osului; localizările cele mai frecvente sînt cele craniene, determinînd exoftalmie, diabet insipid, tulburări de creștere (compresiuni pe hipofiză), tulburări ale sistemului nervos central.

Examenul radiologic al scheletului arată prezența de lacune multiple, clare.

Boala nu are caracter familial. Debutează la copii mici, între 2 și 5 ani.

Cînd este invadată și măduva hematogenă, apare anemie aplastică. Splina este clinic deseori normală.

Colesterolul în sînge poate fi crescut sau normal.

Puncția tumoretelor osoase, a zonelor lacunare sau puncția sternală, uneori, arată prezența de celule spumoase mari, xantomatoase, încărcate cu esteri ai colesterolului, care se pun în evidență cu coloranți electivi : Scharlach și Sudan III.

Evoluția este lentă și în funcție de localizare. Prognosticul nu este totdeauna fatal.

SARCOLEUCOZELE

Sarcoleucoza nu reprezintă o entitate independentă. Sub aceeași denumire sînt cuprinse toate formele de leucoză care evoluează sub aspectul unei tumori sarcomatoase însoțite sau urmate de prezența celulelor blastice în sînge.

Rezultă de aici că orice formațiune tumorală a organelor hematopoetice trebuie studiată, atît local (puncție tumorală, biopsie), cît și general, printr-un examen complet al sîngelui și măduvei hematogene (limfoleucosarcomatoză, reticulosarcomatoză etc.).

Cloroleucoza (cloromul) se caracterizează prin prezența de formațiuni tumorale de culoare verzuie. Apare mai ales la copii. Citologic, tumorile sînt formate din celule de origine mielogenă : mieloblaști, promielocite etc. Clinic și hematologic tabloul este de tipul leucozei acute; în sîngele periferic se întîlnesc numeroși mieloblaști.

RETICULOZE ACUTE SAU RETICULO-ENDOTELIOZE ACUTE

(Reticuloza histiomonocitară Cazal)

Sub această denumire se grupează o serie de reticuloze neoplazice cu evoluţie şi caracteristice leucozice, cu mers acut, mai rar subacut sau cronic.

Cu denumirea de reticuloză histiomonocitară, Cazal a încercat să exprime şi să scoată în evidenţă caracterul comun al acestei stări, diferit denumite de diverşi autori.

Reticuloza histiomonocitară, după Cazal, este o boală caracterizată prin proliferarea metaplazică a celulelor sistemului reticulohistiocitar, care pot să treacă în sînge sub forma unor monocite (histiocite), mai mult sau mai puţin tipice.

Majoritatea cazurilor de reticuloze acute, cunoscute pînă în prezent, au fost observate la copii mici şi 35% din cazuri au fost descrise la sugari şi copii sub 3 ani. Reticuloza acută a nounăscutului este mai bine cunoscută sub numele de boala Letterer-Siwe.

Numărul de leucocite în sîngele periferic este normal în circa 30% din cazuri sau sub cifra normală evoluînd cu leucopenie. În rest numărul de leucocite este uşor crescut şi în 5% din cazuri foarte crescut. Unele forme care au evoluat cu leucopenie prezintă o puternică leucocitoză în perioada terminală.

În formulă se găsesc un număr crescut de monocite tipice, dar mai ales forme atipice cu nucleul foarte segmentat, lobulat, cu nucleoli, elemente de orientare de mare valoare.

Puncţia centrelor hematopoietice permite precizarea diagnosticului. În acest caz, tabloul este identic, fie că este vorba de măduvă, splină sau ganglioni. Se găsesc elemente histiocitare poligonale cu nucleul clar reticular şi citoplasmă abundentă uşor bazofilă sau cu nuanţă eozinofilă, care reprezintă imensa majoritate a celulelor prezente pe lamă. Pe lîngă aceste elemente se mai găseşte un procentaj variabil de celule mari cu nucleul unic oval, sau nucleul polilobat, sau cu mai mulţi nuclei ovali, amintind prin monstruozitatea lor celulele Sternberg. Totuşi tabloul este dominat prin proliferarea monoformă reticulohistiocitară pe cînd în boala Hodgkin trăsătura caracteristică este polimorfismul cu celule gigante (granulomul).

MACROGLOBULINEMIA

(Boala Waldenström)

Afecţiunea se observă mai ales după vîrsta de 65 de ani, rar la 50 de ani. Clinic se caracterizează prin :

— astenie, paloare, pierdere în greutate;

— hemoragii : epistaxis, gingivoragii, hemoragii viscerale;

— splenomegalie în 75% din cazuri, adenomegalie în 45—60% din cazuri.

Sîngele periferic arată :

— Anemie hipercromă în majoritatea cazurilor, uneori normocromă. În unele cazuri apare un test Coombs eritrocitar pozitiv.

— Leucocite numeric normale sau puţin modificate. Formula leucocitară arată o limfocitoză relativă, uneori moderată, alteori crescută, variind între 35 şi 75%. Deseori se întîlnesc celule reticulare limfoide mici.

— Trombopenia este frecventă.

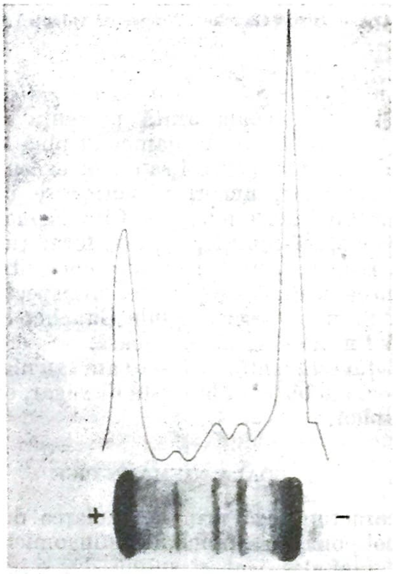


Fig. 191. — Proteinograma serului unui bolnav de boala Waldenström.

Măduva oaselor. Se constată o proliferare moderată sau puternică de celule reticulare limfoide. Aceste celule seamănă cu limfocitele. Aceste celule nu prezintă nici un caracter de malignitate citologică. În măduvă nu se găseşte niciodată o infiltraţie cu plasmocite şi plasmoblaşti comparabilă cu aceea din mielomul multiplu, ci se găseşte numai un număr sporit de plasmocite mature. Caracteristică este însă celula reticulară limfoidă mică, descrisă de Rohr.

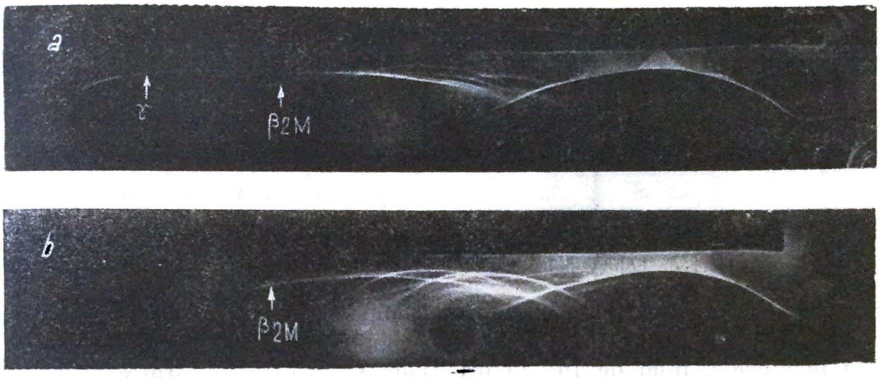


Fig. 192. — Macroglobulinemie Waldenström — imunoelectroforeză ;
a — ser antiproteină umană polivalent.
b — ser antiproteină umană polivalent adsorbit cu γ-globulină.

Examenele biochimice arată:

1. Creşterea importantă a proteinemiei totale: 10–12 g%.
2. Creşterea globulinelor şi scăderea albuminelor, care se însoţeşte de o tendinţă la edeme.
3. Studiul electroforetic: electroforeza pe hîrtie sau în gel de geloză pune în evidenţă în regiunea $\beta_2-\gamma$, o bandă îngustă şi intensă precedată de o fracţiune mai lentă. Înscrierea curbei arată că banda îngustă şi intensă prezintă un vîrf îngust şi foarte înalt care corespunde fracţiunii patologice.

Aspecte imunologice şi imunochimice. Studiul imunologic şi imunochimic al fracţiunii patologice arată că este vorba de macroglobulina β_{2M}. Această macroglobulină β_{2M} migrează în regiunea β_2 avînd o mobilitate intermediară între β şi γ-globuline.

Pentru studiul imunologic al macroglobulinemiei se utilizează metoda imunoelectroforetică şi metoda difuziunii în gel (metoda Ouchterlony).

Ca antigene se utilizează:
— seruri integrale de macroglobulinemie Waldenström;
— soluţii de macroglobuline;
— supernatant seric după precipitarea macroglobulinei;
— albumine şi γ-globuline umane pure;
— seruri umane normale.

Ca anticorpi se utilizează:
— ser imun de cal anti-om;
— ser imun de iepure sau capră anti-om;
— ser imun de iepure anti-ser de bolnav;
— acelaşi ser imun adsorbit cu albumină şi γ-globuline pure;
— acelaşi ser adsorbit cu macroglobulină;
— acelaşi ser adsorbit cu albumină, γ-globuline şi macroglobuline;
— ser imun specific antimacroglobulină.

Datele imunoelectroforezei

1. Antiserul dă cu serul de bolnav un arc de precipitare întins în regiunea β_2, situat în interiorul arcului dat de γ-globulină şi de foarte multe ori prezintă o dublă curbură caracteristică pentru macroglobulina β_{2M} (fig. 192).
2. Antiserul polivalent adsorbit cu γ sau cu β_{2A} continuă să pună în evidenţă arcul paraproteinei (fig. 192).

Caractere fizico-chimice ale macroglobulinei β_{2M}.

Prezenţa macroglobulinei produce anumite modificări ca:

— Precipitarea serului de bolnav în gel de geloză, pe lamele de imunoelectroforeză, este o caracteristică a macroglobulinei β_{2M}. Această precipitare se poate constata, atît în rezervorul de antigen, cît şi în spre catod.

— Dificultatea de a întinde frotiul de sînge.

— Viteza de sedimentare a hematiilor considerabil accelerată.

— Viscozitatea serului crescută, mergînd pînă la gelificarea lui la rece (criomacroglobuline).

— Reacțiile de floculare pozitive.

— Glucidele totale în serul de bolnav sînt de 7–8 ori mai crescute decît în serul normal.

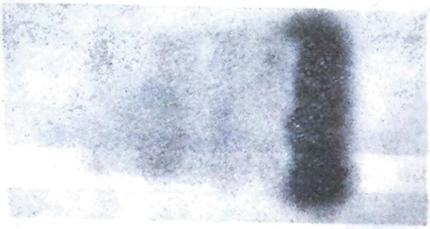


Fig. 193. — Glucidogramă : ser de bolnav de boală Waldenström.

Glucidograma arată că fracțiunea patologică este foarte bogată în glucide, fiind de 10–12 ori mai concentrată față de fracțiunea γ a serului normal (fig. 193 și fig. 194).

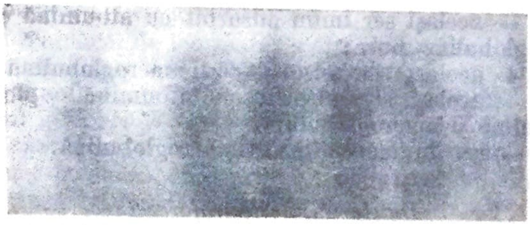


Fig. 194. — Glucidogramă : ser normal.

— **Reacția Sia intens pozitivă pledează pentru natura euglobulinică a fracțiunii patologice, fapt caracteristic pentru β_{2M} globulină și o deosebește de globulina β_{2A} care este o pseudoglobulină.**

Reacția Sia : într-un cilindru de 50 ml plin cu apă bidistilată, se lasă să cadă o picătură de ser de la bolnav. Reacția se execută la temperatura laboratorului. În caz de macroglobulinemie reacția Sia este intens pozitivă. Se observă un precipitat important care apare imediat în primele 2–3 secunde după adaosul picăturii de ser în apă; acest precipitat este foarte dens și dă aspectul unor parașute albe și numeroase ce cad cu viteză lăsînd uneori în urma lor o dîră subțire albă ca un fir de mătase. Pe fundul vasului se adună acest precipitat greu și insolubil în apă care la cea mai mică agitare se resuspendă și apoi cade rapid la fund. Acest precipitat care reprezintă macroglobulina poate fi purificat prin spălări repetate cu apă bidistilată.

— Ultracentrifugarea : macroglobulina β_{2M} are o constantă de sedimentare ce poate fi cuprinsă între S_{19} și S_{25}.

Sindromul hemoragic : în boala Waldenström tulburările de hemostază sînt legate de prezența macroglobulinei. În general paraproteinele au un rol capilarotoxic și o acțiune de inhibiție asupra funcțiilor trombocitare. Trombocitele vehiculează un număr mare de factori fixați pe suprafața lor. Prezența de paraproteine în jurul trombocitelor influențează negativ asupra funcțiilor acestor celule.

Sindromul purpuric ce se întîlnește la acești bolnavi este și rezultatul unei staze pronunțate la nivelul capilarelor venoase periferice ca o consecință a îngreunării circulației prin viscozitatea crescută a sîngelui. De asemenea, această tulburare explică și tendința la tromboze multiple ce se întîlnesc la acești bolnavi. Uneori s-au descris anticoagulanți circulanți de tipul antitrombinei.

Evoluția este relativ lentă, fatală în decurs de 2–5 ani. Unele forme pot evolua și 10–16 ani.

Diagnosticul diferențial. Cu mielomul multiplu : din punct de vedere imunochimic mielomul multiplu nu prezintă o macroglobulină β_{2M}. Se descriu în literatură cazuri de macroglobulinemie cu plasmocitoză pronunțată și, invers, cazuri de mielom multiplu cu malignitate crescută, însoțite de macroglobulinemie. Unii autori susțin astfel că n-ar exista o graniță absolută între aceste două boli puternic disproteinemiante.

Progresele făcute însă în ultimul timp în imunochimie au permis să se precizeze că așa-numitele „macroglobuline atipice" cu constanta de sedimentare cuprinsă între 9S și 15S nu sînt macroglobuline β_{2M}, ci mieloame de tip β_{2A} sau γ. Astfel, macroglobulinemia Waldenström este o entitate anatomoclinică bine definită, o boală macroglobulinemică autonomă deosebită de mielom, care intră în cadrul reticulozelor paraproteinemice cu bandă electroforetică îngustă și vîrf înalt și ascuțit.

Cu macroglobulinemiile secundare :

Macroglobulina β_{2M} se găseşte uşor crescută în boli infecţioase şi parazitare cu mers cronic, în colagenoze, în bolile de sînge şi ale sistemului reticulo-histiocitar, în cirozele cu hepatosplenomegalie şi hiperprotidemie.

Aceste afecţiuni se pot elimina uşor, atît prin datele clinice, cît şi prin cele de laborator. În toate macroglobulinemiile secundare fracţiunea β_{2M}, în electroforeza pe hîrtie, este pierdută fără nici o delimitare în regiunea γ, regiune care prezintă o creştere în bandă lată şi omogenă.

Din punct de vedere morfologic mielograma din boala Waldenström seamănă cu aceea dintr-o leucoză limfoidă cronică, dar, atît morfologia sîngelui, cît şi proteinograma exclud acest din urmă diagnostic.

Purpura hiperglobulinemică Waldenström şi crioglobulinemiile se exclud pe baza studiului proteinogramei acestor afecţiuni, fiind lipsite de o creştere a fracţiunei β_{2M}.

STUDIUL HEMOSTAZEI

I. FACTORII COAGULĂRII

Factorii care intervin în fenomenul coagulării se împart în mai multe categorii, după modul lor de acţiune :

— Substratul coagulării : fibrinogenul.
— Acceleratori ai coagulării.
— Activatori ai coagulării
— Inhibitori ai coagulării.

Factorii coagulării se numerotează de la 1 la 10, ordine ce nu are nici o legătură cu mersul fenomenului coagulării sau al hemostazei.

I — Fibrinogenul.
II — Protrombina.
III — Tromboplastina.
IV — Calciul ionic.
V — Proaccelerina.
VI — Accelerina.
VII — Proconvertina — factorul Stuart (complex).
VIII — Factorul al VIII-lea : globulina antihemofilică A.
IX — Factorul al IX-lea : globulina antihemofilică B (factorul Christmas).
X — Factorul al X-lea : globulina antihemofilică C (P.T.A.).
XI — Factorul Hageman.

După o nomenclatură mai recentă a Comitetului internaţional, factorul Stuart figurează la numărul X în locul factorului P.T.A. Atît factorul P.T.A., cît şi factorul Hageman nu au primit încă o numerotare din partea Comitetului internaţional pînă la precizări suplimentare despre natura şi acţiunea acestor factori.

În expunerile ce urmează folosim numerotarea de la I la X, menţinînd ca factor X factorul C (P.T.A.), iar factorul Stuart în complexul VII.

FIBRINOGENUL

Fibrinogenul este o euglobulină, cu structură liniară de dimensiuni 900/33 Å.

Structura sa îi imprimă caractere speciale de elasticitate, retractibilitate şi extensibilitate, proprietăţi care condiţionează structura cheagului.

Molecula fibrinogenului este alcătuită dintr-un mănunchi de fibre longitudinale interceptate de striaţii.

Sub acţiunea trombinei, fibrinogenul se transformă în fibrină, factor care reprezintă substratul coagulării.

Se găseşte în fracţiunea I a lui Cohn, mobilitate electroforetică între β şi γ.

Nu este adsorbit de sulfatul de bariu, fosfatul tricalcic sau hidroxidul de aluminiu ; nu este reţinut de filtrul Seitz 20% amiantă.

Se distruge la 56°, în 3 minute.

PROTROMBINA

Protrombina este sintetizată de celula hepatică în prezenţa vitaminei K. Sistemul reticulohistiocitar poate de asemenea sintetiza protrombină.

Greutatea ei moleculară este de 140 000, iar a trombinei de 77 000.

S-a emis ipoteza că protrombina se dedublează în două molecule dînd trombină.

În cursul coagulării, protrombina este transformată în trombină sub influenţa tromboplastinei endogene active, în prezenţa ionilor de Ca^{++} şi a acceleratorilor.

În ser mai rămîne însă, după 4 ore de la coagulare, o cantitate de protrombină denumită reziduală, în proporţie de 10%.

Protrombina este adsorbită de sulfatul de bariu, fosfatul tricalcic şi hidroxidul de aluminiu. Traversează filtrul Seitz 20% amiantă. Se distruge la 56° în 10 minute.

TROMBOPLASTINA

Sub influenţa tromboplastinei, protrombina se transformă în trombină. Pentru a produce această transformare, tromboplastina trebuie să se activeze. Această activare se face prin intermediul acceleratorilor: factorii al V-lea, al VII-lea şi factorul Stuart, în prezenţa ionilor de calciu.

O substanţă are activitate tromboplastică, dacă accelerează coagularea unei plasme normale recalcifiate.

Există mai multe tromboplastine: tromboplastina tisulară, factorii tromboplastici plasmatici (VIII, IX, X), factorul tromboplastic trombocitar (factorul al III-lea trombocitar).

Factorii tromboplastici plasmatici şi cu cel trombocitar reprezintă *tromboplastina endogenă*. Pentru a deveni activă, tromboplastina endogenă are nevoie de accelerină, de factorul Stuart şi de ionii de Ca^{++}, proconvertina nefiind necesară. Tromboplastina tisulară are nevoie, pentru a deveni activă, de prezenţa factorilor acceleratori: accelerina, proconvertina, factorul Stuart şi ionii de Ca^{++}. În aceasta constă diferenţa între tromboplastina endogenă şi cea tisulară.

Alte substanţe cu activitate tromboplastică, folosite în coagulare, sînt veninul de viperă Russel şi tripsina; ele pot transforma protrombina în trombină. Pentru această transformare, veninul de viperă Russel şi tripsina nu au nevoie de prezenţa proconvertinei, ci numai de accelerină, factor Stuart şi ioni de calciu.

Cu alte cuvinte, timpul de tripsină şi timpul cu venin de viperă Russel (timpul Stypven) sînt normali în cazul deficienţei în proconvertină şi prelungiţi în cazul deficienţei în factor Stuart.

Pe aceste fapte se bazează diferenţierea esenţială şi directă între proconvertină şi factorul Stuart.

Aceste două substanţe tromboplastice se comportă deci la fel ca tromboplastina endogenă.

CALCIUL SUB FORMĂ IONIZATĂ

Acest factor este indispensabil în majoritatea reacţiilor fenomenului de coagulare. Ionii de calciu activează profactorii, plasmatici concentraţia optimă fiind de 1,25 pînă la 2,5 miliosmoli.

PROACCELERINA ŞI ACCELERINA

Proaccelerina (factorul al V-lea), o pseudoglobulină, este precursorul accelerinei (factorul al VI-lea), accelerina fiind forma activă. Activarea se face sub acţiunea trombinei. Accelerina are rol accelerator în fenomenul coagulării, acţionînd atît în formarea tromboplastinei endogene active, cît şi în transformarea protrombinei în trombină.

Accelerina se consumă în cursul coagulării sîngelui, deci este prezentă în plasmă şi scade, pînă la dispariţie, în ser. Este foarte labilă (de unde şi denumirea de factor labil), la conservare dispărînd rapid din plasmă.

Accelerina nu este adsorbită de sulfatul de bariu, de fosfatul tricalcic sau de hidroxidul de aluminiu; nu este reţinută de filtrul Seitz 20%.

PROCONVERTINA SAU FACTORUL AL VII-lea

Acesta este precursorul convertinei, activarea făcîndu-se sub acţiunea tromboplastinei endogene active sau a celei tisulare şi a suprafeţelor rugoase (vas lezat, perete de sticlă). Are un rol accelerator în fenomenul coagulării, locul de acţiune fiind la nivelul complexului protrombinic; accelerează transformarea protrombinei în trombină.

Proconvertina nu intervine în formarea tromboplastinei endogene active.

În cursul coagulării, proconvertina se transformă în convertină, dar convertina nu se consumă: rămîne intactă, găsindu-se atît în plasmă, cît şi în ser, nemodificată.

Acest factor este foarte stabil la conservare şi se poate găsi în plasmă sau în ser după săptămîni şi luni de conservare.

Proconvertina este adsorbită de sulfatul de bariu şi de fosfatul tricalcic; nu traversează filtrul Seitz care conţine 20% amiantă, astfel încît filtrarea se foloseşte pentru a o separa de protrombină, accelerină şi fibrinogen (vezi timpul de proconvertină). Se distruge la 56°, în 5 minute.

Proconvertina este sintetizată de celula hepatică în prezenţa vitaminei K, fiind influenţată ca şi protrombina, de aceiaşi factori etio-patogenici.

Factorul Stuart, descoperit în ultimii ani, este un accelerator. Acționează în etapa formării tromboplastinei endogene, activînd împreună cu accelerina și ionii de calciu, această tromboplastină. De asemenea intervine în transformarea protrombinei în trombină, activînd tromboplastina tisulară.

Factorul Stuart, ca și proconvertina, nu se consumă în cursul coagulării, găsindu-se atît în plasmă, cît și în ser. Este adsorbit de sulfatul de bariu și de fosfatul tricalcic și este reținut de filtrul Seitz 20% amiantă.

Proconvertina și factorul Stuart fac parte din așa-numitul complex VII, sinteza lor fiind sub dependența Vitaminei K.

FACTORUL AL VIII-lea SAU GLOBULINA ANTIHEMOFILICĂ A

Aceasta este o β_2-globulină care ia parte la formarea tromboplastinei endogene. Se consumă în cursul coagulării și deci se găsește în plasmă și lipsește în ser. Este un factor destul de labil și concentrația lui scade după cîteva zile de conservare. Factorul A nu este adsorbit de sulfatul de bariu, de fosfatul tricalcic sau de hidroxidul de aluminiu. Traversează filtrul Seitz 20%. Se distruge la 60°, în 5 minute. Se găsește în fracțiunea I a lui Cohn.

FACTORUL AL IX-lea SAU GLOBULINA ANTIHEMOFILICĂ B

Factorul Christmas este o β_2-globulină, care ia parte la formarea tromboplastinei endogene. Nu se consumă în cursul coagulării, găsindu-se deci atît în plasmă, cît și în ser. Este un factor foarte stabil la conservare. Factorul B este adsorbit de sulfatul de bariu, de fosfatul tricalcic și de hidroxidul de aluminiu. Este reținut de filtrul Seitz 20%. Se distruge la 56° în 10 minute. Este sintetizată în prezența vitaminei K.

FACTORUL AL X-lea SAU GLOBULINA ANTIHEMOFILICĂ C (P T A)

Acest factor ia parte la formarea tromboplastinei endogene. Nu se consumă în cursul coagulării, găsindu-se atît în plasmă, cît și în ser. Nu este adsorbitde sulfatul de bariu, de fosfatul tricalcic sau de hidroxidul de aluminiu. Se distruge la 56°, în 30 de minute.

Factorul al III-lea trombocitar și factorii A, B și C se numesc și protromboplastine, contribuind prin interacțiunea lor la formarea tromboplastinei endogene.

Factorul Hageman : prezent în plasmă sub formă inactivă este activat în contact cu suprafețele udabile și se găsește neconsumat în ser. În prezența ionilor de Ca^{++} se asociază cu profactorul C (P.T.A.), pentru a da un factor protromboplastic C activ. Factorul Hageman participă și la activarea factorului B. Nu este adsorbit de SO_4Ba, este prezent în ser cu o activitate crescută, puțin sensibil la învechire, rezistă la încălzire de 60° timp de 30 de minute.

VITAMINELE K ȘI ROLUL LOR ÎN COAGULARE

În stare naturală vitaminele K sînt liposolubile și au o origine dublă :

— Origine exogenă — alimentară : Vitamina K_1 se găsește în roșii, verdeață, lucernă, portocale, orez, gălbenuș de ou, brînzeturi și se poate obține sintetic.

— Origine endogenă — intestinală : vitamina K_2.

Vitamina K_2 se sintetizează la nivelul intestinului gros prin flora saprofită microbiană intestinală în special de *Escherichia coli*.

Aceste vitamine K_1 și K_2 sînt liposolubile și nu pot fi absorbite decît în prezența bilei.

Vitaminele K joacă un rol important în hemostază. Ele intervin în sinteza protrombinei, proconvertinei, factorului Stuart și a factorului B. Acești patru factori sînt denumiți factori adsorbabili, deoarece se adsorb de către substanțe ca sulfatul de bariu.

Antivitaminele K : unele substanțe înrudite stereochimic cu vitaminele K sînt susceptibile de a se substitui acestor vitamine prin afinitate competițională, blocînd astfel ciclul enzimatic necesar la sinteza factorilor de coagulare sub dependența vitaminelor K. Cele mai importante dintre aceste substanțe sînt dicumarolul și derivații de dicumarol folosiți ca anticoagulanți cu acțiune numai *in vivo*, pentru combaterea stărilor de hipercoagulabilitate.

*

Din cele expuse pînă aici, rezultă că proaccelerina, proconvertina și factorul Stuart sînt factori acceleratori ai coagulării.

Se numesc *activatori*, factorii care, acționînd asupra profactorilor, îi transformă în factori activi, îi activează. Astfel, trombina este un factor activator, fiindcă activează proaccelerina în accelerină; tromboplastina endogenă activă este de asemenea un activator, fiindcă activează proconvertina în convertină. Ionii de calciu sînt indispensabili la activarea profactorilor plasmatici.

Factorii trombocitari au următoarele acţiuni:

1. Accelerator al transformării protrombinei în trombină.

2. Accelerator al transformării fibrinogenului în fibrină sub acţiunea trombinei.

3. Factorul al III-lea tromboplastic intervine în formarea tromboplastinei endogene active, împreună cu tromboplastinele plasmatice (factor protromboplastic de natură fosfolipidică). Rezistă la o încălzire prelungită la 56°.

4. Factorul antiheparinic.

5. Serotonina este o substanţă cu acţiune vasoconstrictoare arteriolară. Serotonina nu se produce în trombocit. Ea este produsă în mucoasa gastrointestinală de celulele argentafine, trombocitele avînd numai rolul de a o adsorbi pe suprafaţa lor, transportînd-o.

6. Retractozimul reprezintă substanţa de origine trombocitară, care produce retracţia cheagului.

7. Antifibrinolizina.

Factorii coagulării fixaţi şi vehiculaţi de trombocite sînt următorii:

1. Factorul antihemofilic A.
2. Factorul antihemofilic B.
3. Proaccelerina.
4. Proconvertina şi factorul Stuart.
5. Protrombina.
6. Fibrinogenul.
7. Calciul.
8. Serotonina.

Aceşti factori sînt adsorbiţi pe suprafaţa trombocitelor şi se pot îndepărta prin spălarea celulelor.

Funcţiile trombocitului şi rolul în hemostază. În hemostază, trombocitele acţionează în felul următor:

1. Primul timp al hemostazei:

— acţiune vasoconstrictoare prin intervenţia serotoninei.

2. Al doilea timp al hemostazei:

— adezivitate: aderă de pereţii vasculari lezaţi, la corpi străini;

— aglutinabilitatea trombocitelor între ele.

3. Al treilea timp al hemostazei:

— acţiunea protromboplastică: factor al III-lea trombocitar de natură lipidică;

— acţiunea de accelerare a trombinoformării;

— acţiunea de accelerare a fibrinoformării;

— acţiunea antiheparinică;

4. Al patrulea timp al hemostazei:

— acţiunea de retracţie a cheagului.

5. Al cincilea timp al hemostazei:

— acţiunea antifibrinolitică.

II. MECANISMUL HEMOSTAZEI

Hemostaza este un fenomen complex fiziologic, care se opune hemoragiei, asigurînd o stare de izocoagulabilitate prin integritatea pereţilor vasculari (conţinător) şi a factorilor umorali (conţinut).

În mod normal, organismul se găseşte în stare de izocoagulabilitate. Modificările în minus sau în plus, spre hipocoagulabilitate sau hipercoagulabilitate, indică o dereglare a mecanismului hemostazei şi echivalează cu starea de boală.

TIMPII HEMOSTAZEI

Hemostaza cuprinde 5 timpi:

1. Timpul parietal.
2. Formarea trombului alb trombocitar.
3. Coagularea.
4. Retracţia cheagului.
5. Fibrinoliza.

1. TIMPUL PARIETAL

O leziune capilară, care formează o soluţie de continuitate, produce imediat o capilaroconstricţie printr-un mecanism nervos reflex (reflex axonic), acţionînd asupra sfincterelor precapilare. Acest timp durează cîteva zeci de secunde. Cu cît vasele sînt de calibru mai mic, cu atît acest fenomen este mai eficace şi mai durabil.

2. FORMAREA TROMBULUI ALB TROMBOCITAR

Trombocitele circulante, găsind la nivelul leziunii capilare o suprafaţă rugoasă, datorită proprietăţilor lor fiziologice, aderă pe această suprafaţă şi se îngrămădesc aglutinîndu-se şi formînd trombul alb trombocitar. Trombocitele pun în libertate diferiţii factori necesari coagulării.

3. COAGULAREA

Coagularea este al treilea timp al hemostazei, cel mai complicat, dar şi cel mai bine studiat.

Coagularea la rîndul ei se împarte în 3 timpi denumiţi şi faze:

a) Prima fază: formarea tromboplastinei endogene active.

b) A doua fază: convertirea protrombinei în trombină.

c) A treia fază: trombina transformă fibrinonogenul în fibrină.

Prima fază: formarea tromboplastinei endogene active (activator sanguin sau intrinsec).

Tromboplastina endogenă activă se formează din interacţiunea următorilor factori:

Factor Hageman + contact→Hageman activat

Hageman activat + P.T.A. + Ca^{++}→Hageman + P.T.A. produs activat

Hageman + P.T.A. activat + IX→ Factor IX activat

Factor IX activat + VIII + Stuart→Produs intermediar I

Produs intermediar I + Factor 3 Plachetar →Produs intermediar II

Produs intermediar II + VI→ Tromboplastină endogenă activă (activator sanguin, intrinsec).

Timpul de formare a tromboplastinei endogene active este şi timpul de coagulare a sîngelui (6–12 min.), deoarece timpii fazei a doua şi a treia se petrec în cîteva secunde, fiind denumiţi şi timpi explozivi.

A doua fază: convertirea protrombinei în trombină. Sub influenţa tromboplastinei endogene active şi în prezenţa ionilor de calciu protrombina este transformată în trombină.

A treia fază: transformarea fibrinogenului în fibrină se face sub influenţa trombinei. Această acţiune este de natură proteolitică. Trombina separă din molecula de fibrinogen două mici particule denumite fibrinopeptide A şi B ce se găsesc fixate sub formă de apendice pe suprafaţa moleculei de fibrinogen. Aceste fibrinopeptide sînt puternic încărcate cu sarcini electronegative şi se opun polimerizării. După acţiunea trombinei, prin îndepărtarea fibrinopeptidelor, polimerizarea se produce spontan prin lipirea monomerilor de fibrină, trombina intervenind numai în primul timp.

Pentru ca să se formeze o reţea de fibrină stabilă şi definitivă, este necesară intervenţia unei noi enzime, factorul stabilizator al fibrinei (F.S.F.). Acest factor ajută la întărirea legăturilor polipeptidice. Absenţa acestui factor (F.S.F.), pus în evidenţă de Koller, produce o diateză hemoragică gravă.

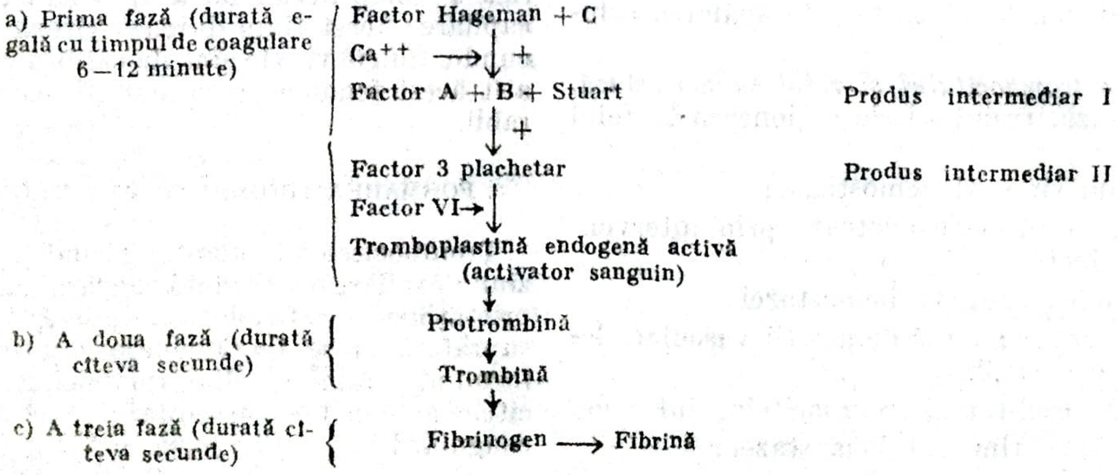
Transformarea protrombinei în trombină se poate face prin două căi fiziologice diferite.

1. Prin intermediul tromboplastinei endogene active, denumită şi activator sanguin, acest produs se formează numai din constituenţi sanguini şi a luat denumirea de sistem de coagulare intrinsec.

2. Prin intermediul tromboplastinei tisulare active denumită şi activator tisular; acest sistem de coagulare a fost denumit extrinsec deoarece necesită un factor de provenienţă extravasculară care este tromboplastina tisulară. Un exemplu de coagulare extrinsecă *in vitro* este timpul de protrombină a lui Quick.

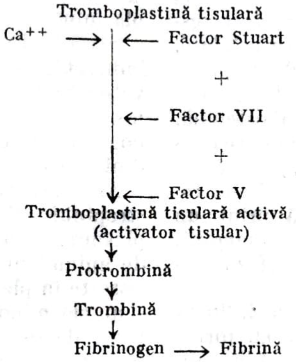
Cele trei faze ale coagulării

(*Coagulare intrinsecă*)


a) Prima fază (durată egală cu timpul de coagulare 6–12 minute)
Factor Hageman + C
Ca++
+
Factor A + B + Stuart
+
Produs intermediar I
Factor 3 plachetar
Produs intermediar II
Factor VI
Tromboplastină endogenă activă (activator sanguin)
b) A doua fază (durată cîteva secunde)
Protrombină
Trombină
c) A treia fază (durată cîteva secunde)
Fibrinogen
Fibrină

Schema activării tromboplastinei tisulare

(*Coagulare extrinsecă*)



Diferența între tromboplastina endogenă și tromboplastina tisulară. Pentru a deveni activă tromboplastina endogenă nu are nevoie de proconvertină. Coagularea intrinsecă se face în absența totală a proconvertinei.

Tromboplastina tisulară pentru a se activa, pe lîngă ionii de calciu, a factorului Stuart și a proaccelerinei, necesită și prezența proconvertinei.

Fiecare din cele două sisteme de coagulare posedă factori proprii, iar unii factori sînt comuni ambelor sisteme.

Astfel factorul VII și tromboplastina tisulară nu se întîlnesc decît în sistemul extrinsec.

Factorii Hageman, P.T.A., VIII, IX și factorul 3 plachetar caracterizează sistemul intrinsec. Factorii V, Stuart și Calciul sînt comuni ambelor sisteme.

Comportarea factorilor în funcție de desfășurarea fenomenului coagulării.

În cursul procesului de coagulare unii din factori dispar se consumă, iar alții nu se consumă, ci își conservă toată activitatea lor.

Factorii care se consumă intervin sub formă de substrat în acest proces, iar cei ce nu se consumă intervin sub formă de enzime.

Sistemul intrinsec:

— Factori ce nu se consumă în cursul procesului de coagulare: factorii Stuart, P.T.A., Hageman, factorul IX și Ca.

— Factori ce se consumă: V, VIII; fibrinogenul și protrombina.

Sistemul extrinsec:

— Factori ce nu se consumă: Ca, factorul VII.

— Factori ce se consumă: fibrinogenul, protrombina, proaccelerina, factorul Stuart.

Factorul Stuart intervine în sistemul extrinsec ca un substrat, consumîndu-se, iar în sistemul intrinsec ca o enzimă ce nu se consumă.

4. RETRACȚIA CHEAGULUI

După coagularea sîngelui cheagul de fibrină se retractă lăsînd să se expulzeze serul. Retracția cheagului este în funcție de starea cantitativă și calitativă a trombocitelor.

Sub acțiunea trombinei trombocitele se aglutinează și suferă fenomenul denumit metamorfoză vîscoasă. Acest fenomen constă într-o alterare morfologică a trombocitelor care devin niște formațiuni hialine fără să se distingă structura granulomerului, se adună în grămezi și agregatele trombocitare se contractă.

Contracția agregatelor de trombocite provoacă retracția cheagului sanguin încît se poate afirma o identitate între aceste două fenomene adică metamorfoza vîscoasă și retracția cheagului. Toate aceste modificări, sînt, în cele din urmă, expresia unui travaliu ce utilizează energie mecanică.

Trombocitele sînt deosebit de bogate în A.T.P. În cursul coagulării sîngelui concentrația lor în A.T.P. scade. De asemenea, prin învechire, activitatea retractilă a trombocitelor scade în același timp cu scăderea concentrației de A.T.P., și sînt incapabile de a asigura o hemostază normală pierzîndu-și și tendința de a se agrega sub influența trombinei.

Retracția cheagului a fost comparată cu alte procese de contracție activă și în primul rînd cu contracţia musculară, dat fiind rolul preponderent jucat de A.T.P. în ambele fenomene.

În contracţia musculară intervine o proteină contractilă de tipul actomiozinei care este responsabilă de modificările morfologice celulare.

Bettex-Galland şi Lüscher (1959) au putut izola din trombocitele umane o proteină contractilă pe care au denumit-o trombostenină. Această substanţă se contractă, în anumite condiţii *in vitro*, prin adaus de A.T.P.

Astfel, din punctul de vedere biochimic, retracţia cheagului este caracterizată printr-un consum activ de A.T.P. şi o glicoliză exagerată, caractere strîns legate şi de metamorfoza vîscoasă.

Modificările cantitative şi calitative influenţează direct retracţia cheagului. În unele forme de trombastenii, trombocitele prezintă o deficienţă a sistemului glicolitic. Această deficienţă se caracterizează printr-o scădere în A.T.P. şi în consecinţă trombocitele sînt incapabile de a efectua metamorfoza vîscoasă.

5. FIBRINOLIZA

În mod normal, cheagul se poate liza parţial după mai multe ore de la coagularea sîngelui. Această liză se produce sub influenţa unei enzime, plasminogenul, care se transformă în plasmină (formă activă). Este un ferment proteolitic.

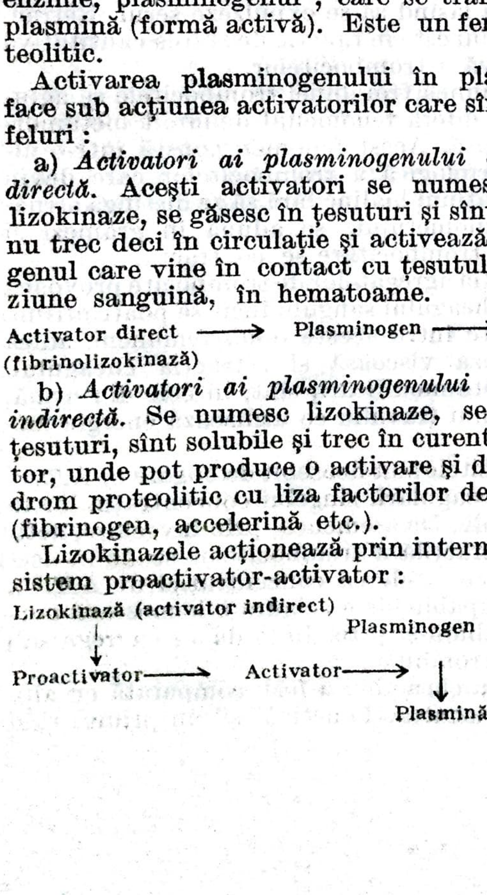
Activarea plasminogenului în plasmină se face sub acţiunea activatorilor care sînt de două feluri:

a) *Activatori ai plasminogenului cu acţiune directă.* Aceşti activatori se numesc fibrinolizokinaze, se găsesc în ţesuturi şi sînt insolubili nu trec deci în circulaţie şi activează plasminogenul care vine în contact cu ţesutul prin sufuziune sanguină, în hematoame.

Activator direct ⟶ Plasminogen ⟶ Plasmină
(fibrinolizokinază)

b) *Activatori ai plasminogenului cu acţiune indirectă.* Se numesc lizokinaze, se găsesc în ţesuturi, sînt solubile şi trec în curentul circulator, unde pot produce o activare şi deci un sindrom proteolitic cu liza factorilor de coagulare (fibrinogen, accelerină etc.).

Lizokinazele acţionează prin intermediul unui sistem proactivator-activator:



Proactivatorul se găseşte în sînge şi se transformă în activator sub influenţa lizokinazelor, iar activatorul transformă plasminogenul în plasmină.

Streptokinaza este tot o lizokinază cu acţiune indirectă, care activează proactivatorul în activator. Streptokinaza, ca şi lizokinazele din organism nu au nici o acţiune directă asupra plasminogenului; ele acţionează numai prin intermediul proactivatorului.

Astfel, dacă la o plasmă de animal se adaugă streptokinază, nu se produce liză, nu se obţine plasmină. S-a crezut greşit la început că plasma de animal nu conţine plasminogen. Ceea ce lipseşte în plasma de animal este proactivatorul şi nu plasminogenul. Dacă se adaugă o mică fracţiune de ser uman peste plasma de animal, în prezenţa streptokinazei, fenomenul litic se manifestă intens prin transformarea plasminogenului în plasmină, serul uman fiind sursa de proactivator.

Inhibitorii sistemului litic sînt antiplasmina, antiactivatorii.

FENOMENUL AUTOCATALITIC AL HEMOSTAZEI

1. Cînd se produce o soluţie de continuitate într-un ţesut prin leziunea capilarelor, sîngele transvazat vine în contact cu tromboplastina tisulară. Pentru cîteva secunde intervine primul timp al hemostazei care, prin vasoconstricţie reflexă, opreşte hemoragia.

2. Tromboplastina tisulară — în prezenţa ionilor de calciu şi acceleratorilor — acţionează asupra unei cantităţi infime de protrombină pe care o transformă în trombină. Activarea tromboplastinei tisulare în acest stadiu se face în felul următor: prezenţa acestei tromboplastine produce activarea unei mici cantităţi de proconvertină, în convertină, factorul Stuart există ca atare, iar pentru accelerină se admite că, în sînge, există urme fine de accelerină, prin activarea proaccelerinei.

3. Formarea unei mici cantităţi de trombină la nivelul plăgii constituie factorul cel mai important, scînteia de la care porneşte fenomenul autocatalitic al coagulării sîngelui. Această cantitate infimă de trombină declanşează o serie de reacţii în lanţ care duc în cele din urmă tot la formarea de trombină, săvîrşind coagularea.

Reacţiile se petrec după cum urmează:

a) Trombina acţionează asupra fibrinogenului: apare un cheag mic de fibrină care favorizează îngrămădirea trombocitelor.

b) Trombina activează proaccelerina în accelerină. Produce şi aglutinarea trombocitelor care suferă metamorfoza vîscoasă.

c) Factorul Hageman este activat în contact cu suprafaţa endoteliului capilar lezat, activînd, la rîndul lui, factorul C şi factorul B.

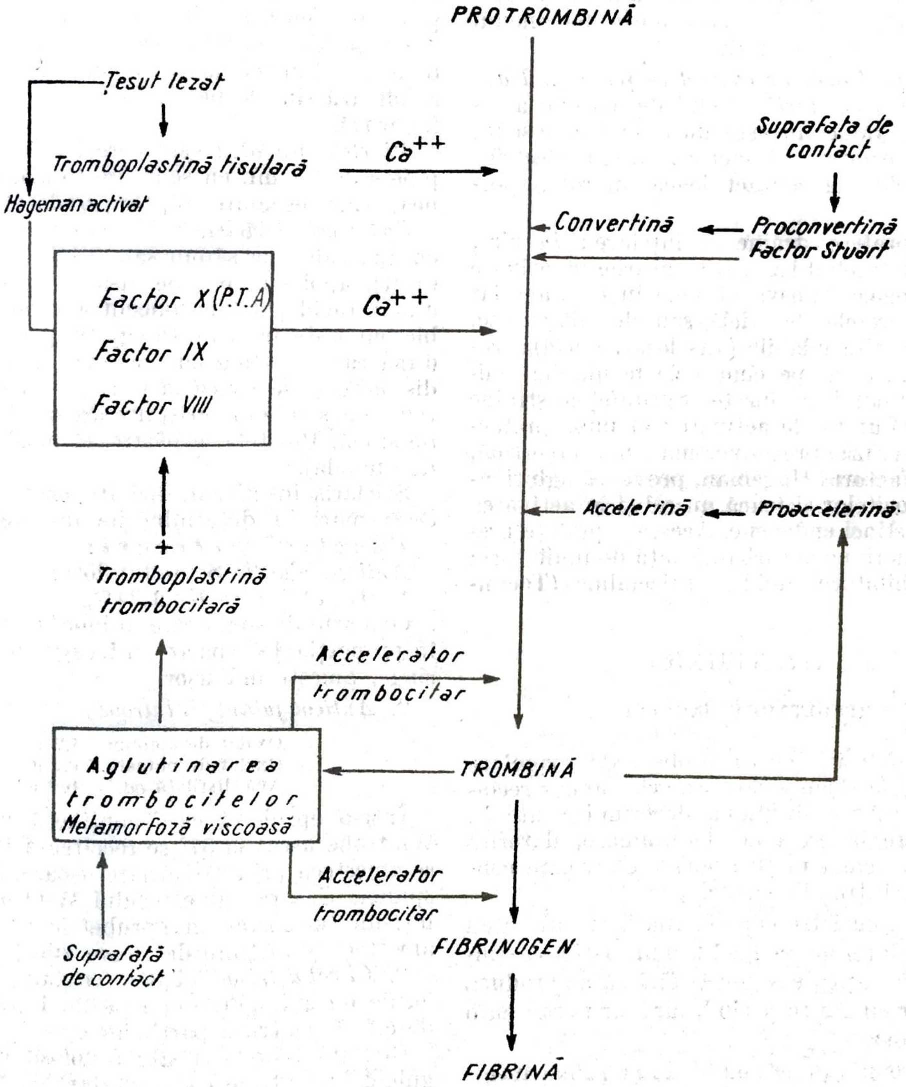

PROTROMBINĂ
Ţesut lezat
Tromboplastină tisulară
Ca++
Hageman activat
Suprafaţa de contact
Convertină
Proconvertină
Factor Stuart
Factor X (P.T.A)
Factor IX
Factor VIII
Ca++
Accelerină
Proaccelerină
+
Tromboplastină trombocitară
Accelerator trombocitar
Aglutinarea trombocitelor
Metamorfoză vîscoasă
TROMBINĂ
Accelerator trombocitar
Suprafaţă de contact
FIBRINOGEN
FIBRINĂ

Fig. 195. — Schema mecanismului hemostazei. Fenomenul autocatalitic.

d) Trombocitele pun în libertate factorul 3 trombocitar, care, împreună cu tromboplastinele plasmatice A, B şi C, în prezenţa acceleratorilor, declanşează formarea tromboplastinei endogene active.

Intervin şi alţi factori trombocitari: unul ca accelerator al transformării protrombinei în trombină, altul ca accelerator al transformării fibrinogenului în fibrină.

În acest moment sînt îndeplinite toate condițiile pentru a transforma protrombina în trombină și se produce coagularea masivă a sîngelui din regiunea plăgii.

Astfel, primele urme de trombină formată la început, sub acțiunea tromboplastinei tisulare, declanșează seria de reacții care duc tot la formarea de trombină. Din acest motiv, fenomenul a fost denumit autocatalitic.

Rolul suprafețelor de contact în fenomenul autocatalitic al coagulării. Modul de acțiune a suprafețelor străine nu este încă bine cunoscut; se pare că, printre alți factori, sarcina electrică a suprafețelor de contact joacă un rol important.

Prin suprafețe străine se înțelege: *in vivo*, vasul cu endoteliul lezat și țesuturile învecinate cu care sîngele transvazat vine în contact, iar *in vitro*, peretele de sticlă sau de silicon etc. Suprafețele zise udabile (vas lezat, sticlă) provoacă coagularea, pe cînd cele neudabile (silicon etc.) sînt relativ inerte. Suprafețele străine active joacă un rol de activator al unor profactori: activează proconvertina în convertină, activează factorul Hageman, provoacă aglutinarea trombocitelor și joacă un rol și în activarea tromboplastinei endogene. Aceste suprafețe prezintă și o acțiune adsorbantă față de inhibitori: adsorb inhibitorul lipidic anticefalina (**Tocantins**).

III. TEHNICI

RECOLTAREA SÎNGELUI

Sîngele folosit pentru probele de coagulare trebuie să fie sînge venos. Sîngele capilar recoltat prin înțepare din pulpa degetului poate să dea naștere la erori de determinare, datorită amestecului sîngelui cu sucul tisular, care conține factori tromboplastici.

Puncția venei trebuie efectuată cu un ac cu diametrul interior de 1–1,2 mm, astfel ca sîngele să vină ușor în seringă, fără să se producă spumă, iar cînd este posibil, fără stază sau cu o stază moderată.

Vena trebuie puncționată de la prima încercare, spre a reduce la minimum amestecul sîngelui cu sucul tisular, bogat în tromboplastină. Se mai recomandă îndepărtarea primilor doi milimetri de sînge, prin schimbarea seringii.

Seringa și acul trebuie să fie sterile și perfect uscate.

Sticlăria:

Alegerea sticlăriei de laborator pentru probele de coagulare are o importanță deosebită.

Eprubetele trebuie să fie toate de același calibru, cu fundul uniform rotund. Se preferă eprubete de dimensiuni 8/100 mm sau 10/100 mm. Folosirea unor eprubete de diametre diferite poate influența rezultatele la unele probe.

Eprubetele de centrifugă: se recomandă eprubete de 10 ml capacitate, cilindrice, în care se recoltează sîngele pe anticoagulant și se centrifughează.

Pipetele gradate: este corect să se folosească pipete de 0,1 ml, cu scurgere totală. De asemenea, sînt necesare pipete gradate de 1 ml.

Spălarea sticlăriei. Se spală cu apă rece, apoi cu apă caldă cu săpun sau VIM (praf de curățat), apoi cu apă. Se lasă în amestec sulfocromic (acid sulfuric concentrat tehnic 1 000 ml, bicromat de potasiu 100 g) timp de 2–3 ore, după care se spală cu apă curentă, apoi cu apă distilată, și se usucă la etuvă la 180°. Eprubetele se păstrează în cristalizoare închise cu capac de sticlă. Pipetele se păstrează închise în hîrtie de ambalaj.

Sticlăria insuficient spălată poate să ducă la erori mari în determinările diferitelor probe.

Reactivi necesari:

Anticoagulanți. Se pot folosi:

1. *Oxalatul de sodiu* 1,34%.

Oxalatul de sodiu este în mod unanim folosit, în proporție de 1 parte anticoagulant la 9 părți sînge, amestecînd ușor.

2. *Anticoagulant Wintrobe*:

Oxalat de amoniu	1,2 g
Oxalat de potasiu	0,8 g
Apă distilată *ad.*	100 ml

Într-o eprubetă care conține 1 ml amestec Wintrobe uscat la 37° se recoltează 10 ml sînge, se amestecă prin răsturnare ușoară, fără a face spumă. Uscarea amestecului Wintrobe se face într-un termostat în eprubetele cu cîte 1 ml amestec. Stau timp de cîteva zile.

3. *Citratul trisodic* 3,8% (cristalizat cu 2 molecule de apă), în proporție de 1 parte soluție de citrat pentru 9 părți sînge.

Citratul trisodic poate fi folosit ca anticoagulant în toate probele, în afară de cea de toleranță la heparină, unde este contraindicat, dînd rezultate eronate.

Tromboplastina se obține din creier de iepure sau din creier uman.

Pentru prepararea tromboplastinei creierul se curăță de vase și meninge și se spală sub un curent de apă abundent pînă se îndepărtează total urmele de sînge. Se taie substanța cenușie cu o foarfecă și se mojarează pînă la obținerea unei paste. Se tratează 1 parte creier cu 3 părți acetonă, amestecînd rapid timp de 5 minute, apoi se filtrează prin cîteva straturi de tifon. Creierul se tratează, în aceleași proporții de 3 ori cu acetonă. Se întinde apoi în plăci Petri în strat subțire și se usucă prin liofilizare. În lipsa aparatului de liofilizare se poate usca în etuvă de vid, la 40°, timp de 24 de ore, în prezența clorurii de calciu ca absorbant. În lipsa etuvei de vid, se poate folosi și termostatul: după 24 de ore la 37°, se mojarează în pulbere fină și, pentru o mai bună uscare, se mai expune această pulbere pentru 24 de ore la 37°, în etuvă de vid sau termostat, în prezența clorurii de calciu puse într-o cutie Petri alăturată.

Pentru întrebuințarea tromboplastinei uscate se dizolvă într-o eprubetă 20–30 mg tromboplastină uscată în 1 ml ser fiziologic. Se ține în baie de apă la 37° timp de o oră, agitînd puternic din 10 în 10 minute. După ultima agitare se lasă în repaus cîteva minute și se lucrează cu supernatantul, care are un aspect opalescent.

Clorura de calciu (recalcificare). Se folosește clorură de calciu p.a. *sicum*, soluție M/40, adică 1,11 g clorură de calciu la 400 ml apă distilată. Pentru o bună conservare a molarității soluției de clorură de calciu se recomandă prepararea în soluție de M/10, adică 1,11 g la 100 ml apă, care se conservă în frigider. La întrebuințare, această soluție concentrată se diluează 1 parte soluție cu 3 părți apă, cu care se lucrează (M/40).

Tampon veronal-acetat (pH 7,35) se prepară astfel:

Soluție veronal-acetat:
Acetat de Na. $3H_2O$ M/7 = 9,714 g
Veronal Na M/7 = 14,714 g

se dizolvă în 500 ml apă distilată.

Tamponul:

Soluție veronal-aceat	250 ml
Clorură de Na 4,25%	200 ml
Acid clorhidric N/10	217 ml
Apă distilată	683 ml

Plasmă adsorbită. Se numește plasmă adsorbită o plasmă tratată cu anumite substanțe anorganice insolubile, care au proprietatea de a adsorbi anumiți factori ai coagulării.

În acest scop se folosesc sulfatul de bariu, fosfatul tricalcic, hidroxidul de aluminiu.

Plasma tratată cu aceste substanțe este lipsită de protrombină, proconvertină, factor Stuart, factor IX.

Folosirea sulfatului de bariu ca adsorbant. Sîngele se recoltează pe oxalat de sodiu 1,34%. Nu se recomandă folosirea citratului. Se centrifughează sîngele cu viteză moderată, se separă plasma, care este apoi din nou centrifugată la viteză mare, 4 000–5 000 ture/minut, timp de 10 minute.

Sulfatul de bariu p.a. sub formă de pulbere se adaugă în proporție de 50–100 mg la 1 ml plasmă. Eprubeta cu acest amestec se agită continuu, în baie de apă la 37°, timp de 20 de minute, avînd pe fund 2–3 bile de sticlă. Apoi se centrifughează la 4 000 ture/minut, timp de 10 minute.

Plasma astfel adsorbită se decantează din eprubeta de centrifugă în alta. În caz că se observă urme de sulfat de bariu, se recomandă o a doua centrifugare.

În caz că sulfatul de bariu folosit nu dă o adsorbție bună, se variază proporția de amestec, putînd merge, după caz, la 120–140 mg de sare de bariu pentru 1 ml plasmă, sau se procedează la spălarea sulfatului de bariu cu apă distilată și centrifugare în proporție de 1 g la 10–20 ml apă, de cîteva ori repetată, apoi uscarea sării la căldura uscată 105°. Se conservă în pulbere, care se cîntărește la nevoie.

Verificarea plasmei adsorbite. Se fac următoarele probe:

1. *Timpul de trombină:*

Plasma adsorbită	0,2 ml
Trombină	0,1 ml

Trebuie să coaguleze, dînd un cheag bun, consistent, care denotă prezența fibrinogenului.

2. *Timpul de protrombină Quick:* plasma adsorbită trebuie să dea un timp de protrombină Quick foarte prelungit, dacă nu infinit. În practică, este suficient ca acest timp să fie peste 2–3 minute.

3. Un amestec în părți egale de plasmă adsorbită pe SO_4Ba și de ser normal vechi de 48–72 de ore trebuie să dea, de asemenea, un timp Quick foarte lung; practic, să fie peste 90 de secunde. Această probă permite de a afirma că plasma adsorbită nu conține de loc protrombină.

Printre factorii complexului protrombinic, plasma adsorbită pe sulfat de bariu este lipsită de protrombină, proconvertină, factor Stuart, conține însă proaccelerină în proporție de 50–100%; de asemenea conține fibrinogen. Factorul IX este adsorbit.

Folosirea fosfatului tricalcic ca adsorbant. Fosfatul tricalcic se prepară astfel:

O soluție de clorură de calciu anhidru 33,3g$^0/_{00}$ se adaugă lent peste o cantitate oarecare de soluție care conține 76 g de fosfat trisodic. Se formează un precipitat, care se spală de cîteva ori pe zi cu apă, timp de 5—6 zile. Se adaugă în cele din urmă apă pînă la 1 litru. Se obține astfel un gel de fosfat tricalcic 0,1 M.

Pentru lucru se diluează fosfatul tricalcic, pentru a obține o soluție de 0,008 M în felul următor: 1 ml fosfat tricalcic 0,1 M se adaugă la 11,5 ml apă.

Pentru adsorbția plasmei se procedează astfel, de exemplu:

Se centrifughează 2 ml fosfat tricalcic 0,008 M timp de 5 minute la 3 000 ture/minut. Se aruncă lichidul supernatant, se usucă pereții eprubetei cu hîrtie de filtru și se adaugă peste gelul precipitat 2 ml plasmă oxalatată. Se amestecă cu o baghetă de sticlă, timp de 10 minute, în baie la 37°, se centrifughează 10 minute la 3 000 ture/minut. Fosfatul tricalcic este complet îndepărtat și se decantează plasma adsorbită.

Controlul și rezultatul sînt identice ca la folosirea sulfatului de bariu.

Plasmă filtrată prin filtrul Seitz. Filtrarea plasmei prin filtrul Seitz se folosește pentru separarea protrombinei de proconvertină.

Filtrul Seitz, cu 20 sau 30% azbest (amiantă) lasă să treacă în parte protrombina și oprește în totalitate trecerea proconvertinei și factorului Stuart.

O plasmă filtrată prin filtrul Seitz 20% conține accelerină, protrombină, fibrinogen și este lipsită de proconvertină și factor Stuart.

Pentru prepararea plasmei filtrate prin filtrul Seitz, reactiv care se folosește la determinarea timpului de proconvertină-Stuart, se recomandă folosirea plasmei de bou, care este bogată în fibrinogen și protrombină. Se folosesc filtre Seitz EK cu 20% azbest. Filtrarea se face într-un balon Kitasato sub vid lent: ritmul filtrării nu trebuie să depășească 50—60 de picături/minut, operația făcîndu-se la temperatura camerei.

Plasma astfel filtrată se împarte în porțiuni mici, în eprubete, și se conservă congelată la —20°.

Plasma filtrată prin filtrul Seitz 20% trebuie să dea un timp Quick peste 1 minut.

Siliconarea. Siliconul este un produs de condensare a moleculelor de metilhidroxisilan, care la rîndul lui derivă, prin hidroliză, din metilclorosilan, avînd ca bază siliciul. Siliconul se depune la suprafața obiectelor de sticlă sau metal, ca un film monomolecular, făcînd astfel să dispară suprafețele rugoase, care grăbesc coagularea, prin distrugerea trombocitelor. Prin siliconare se reduc la minimum fenomenele de suprafață și contact. Sticlăria siliconată devine neudabilă, picăturile de apă alunecă în contact cu siliconul, ca picăturile de mercur.

Sîngele recoltat cu material siliconat, seringă și ace siliconate rămîne incoagulabil circa 20—30 de minute.

Procedeul de siliconare variază după preparatele comerciale, și folosirea prospectului este obligatorie.

Sticlăria care se siliconează nu se spală cu amestec sulfo-cromic, ci se spală cu detergenți, ca praful ALBA. Sticla trebuie să fie perfect curată și uscată.

Produsul comercial Dry Film 9 987 se diluează în toluol 1/4 sau în eter 1/10. Sticlăria se introduce în acest produs, se lasă să se scurgă; eprubetele se umplu, apoi se răstoarnă conținutul și se lasă cu gura în jos. După uscare se spală abundent cu apă distilată. Materialul siliconat se poate spăla și steriliza, fiind folosit pentru 2—3 experimentări.

Silicon Serva: această soluție se folosește ca atare. Eprubetele bine spălate și uscate se umplu cu soluția Serva pentru cîteva minute, apoi se golesc și se lasă cu gura în jos pînă ce se usucă. Se pun timp de 1 oră la 100° căldură uscată, după care se pot utiliza.

Siliconarea peiselor metalice: ace, ambouri etc.

Siliconarea pieselor metalice se obține cu ajutorul unui amoniu cuaternar, clorura de dicocodimetil-amoniu în concentracție de 75% în izopropanol (Arquad).

Soluția izopropilică se diluează în apă distilată pentru a obține o concentrație finală de 1%. Se intoduc piesele metalice, se încălzește soluția pînă ce fierbe 2—3 minute și se lasă să se răcească. Apoi piesele se spală bine cu apă distilată și se usucă. Piesele se pot steriliza la 120°. Siliconarea se repetă înainte de fiecare utilizare.

Distrugerea învelișurilor de silicon.

Amestec 1: NaOH . . . . . 150 g
Apă distilată . . . 300 ml.

După dizolvarea hidratului de sodiu se adaugă 2 litri acetonă și 1,7 litri apă distilată.

Amestec 2: NaOH 100 g se adaugă în 2 l acetonă și 2 l hipoclorit de calciu.

Piesele de sticlă se spală cu apă, apoi se pun în amestecul 1, timp de 12 ore. Se spală cu apă și se pun în amestecul 2, timp de 8 ore. Spălare cu apă de robinet, apoi apă distilată și uscare.

RECOLTAREA STANDARD PENTRU UN EXAMEN COMPLET. COAGULOGRAMA

Se prepară următorul material:

1. O eprubetă de centrifugă, cilindrică, cu fundul rotund, de 10 ml capacitate. Eprubeta are gravat un semn pînă la diviziunea 5 ml şi un al doilea semn pînă la diviziunea 10 ml (aceste notaţii se pot uşor realiza cu ajutorul unei pile obişnuite de tăiat fiole, după ce nivelul este reperat prin adăugare de 5 ml apă şi apoi încă 5 ml).

Într-o astfel de eprubetă se pune soluţia anticoagulantă, oxalatul de sodiu: fie 0,5 ml, şi atunci sîngele se va adăuga pînă la diviziunea 5 ml; fie 1 ml anticoagulant, şi sîngele se va adăuga pînă la diviziunea 10 ml.

Cînd se foloseşte amestecul anticoagulant Wintrobe, uscat, este preferabil ca eprubeta să aibă tot notaţia la 5 ml sau la 10 ml. Eprubetele cu anticoagulant trebuie să fie prevăzute cu un dop de cauciuc, pentru a putea fi răsturnate pentru omogeneizare, cînd se adaugă sîngele.

2. Două eprubete de coagulare de 8/100 mm, cu notaţia pe sticlă pînă la 1 ml, pentru proba de coagulare în eprubetă.

3. O eprubetă de 8/100 mm cu notaţie la 5 ml pentru proba de retracţie a cheagului şi pentru determinarea consumului de protrombină.

După ce materialul menţionat la punctele 1, 2 şi 3 este gata pregătit, se puncţionează vena bolnavului cu o seringă mică şi se scot circa 2 ml sînge care se aruncă, apoi se adaptează o seringă mare de 20 ml capacitate, recoltînd, după caz, 15 sau 20 ml sînge.

Sîngele din seringă se repartizează întîi în eprubeta cu anticoagulant pînă la semnul reper respectiv; se astupă apoi cu un dop şi se răstoarnă blînd, o dată sau de două ori. Apoi restul de sînge se repartizează în celelalte eprubete.

Eprubetele pentru proba de coagulare în eprubetă se pun imediat în baia de 37° şi se urmăreşte timpul de coagulare. Cealaltă eprubetă, pentru determinarea retractibilităţii cheagului şi a consumului de protrombină, se pune imediat, tot în baie la 37°.

În acelaşi timp şi în condiţii identice, *folosind acelaşi material şi aceiaşi reactivi*, se recoltează *probele martor* de la un individ normal, care nu suferă de nici o tulburare a hemostazei. Probele martor se recoltează numai în două eprubete: o probă pe anticoagulant şi a doua, fără anticoagulant, pentru consumul de protrombină.

Centrifugarea: pentru separarea plasmei, sîngele recoltat pe anticoagulant se centrifughează.

Important: centrifugarea trebuie să se facă concomitent cu ambele probe, bolnav şi martor. Turaţia trebuie să fie totdeauna aceeaşi, 1 500–2 000 ture/minut, timp de 5 minute. Nerespectarea condiţiilor de centrifugare poate da variaţii mari de la o determinare la alta.

Probele trebuie efectuate în prima oră de la recoltarea sîngelui. Dacă probele se efectuează 2–3 ore mai tîrziu, plasma se va păstra la +4°, împreună cu plasma normală martor recoltată în condiţii identice.

Majoritatea probelor de coagulare se fac totdeauna în dublu sau triplu exemplar, făcînd media între ele.

Toate probele de coagulare se fac în baie de apă la temperatura de 37°, unde sînt ţinuţi toţi reactivii folosiţi în proba respectivă.

STUDIUL COAGULABILITĂŢII GLOBALE

Studiul coagulabilităţii globale se face prin următoarele probe:

1. Timpul de coagulare.
2. Timpul de recalcificare (Howell).
3. Metoda de coagulare – diluţie.
4. Toleranţa la heparină.

Testele care studiază coagulabilitatea globală indică o stare de hipocoagulabilitate, de hipercoagulabilitate sau de izocoagulabilitate, dar numai atît. Aceste teste nu pot preciza nici faza coagulării, nici factorul care determină deficienţa şi nici natura acestei deficienţe.

Din toate testele coagulabilităţii globale, toleranţa la heparină este testul cel mai sensibil.

1. TIMPUL DE COAGULARE

Metoda Lee şi White

Material necesar:

– Seringi şi ace pentru puncţie venoasă
– Eprubete de coagulare
– Baie de apă la 37°
– Cronometru.

Tehnica. Se puncţionează vena cu o seringă mică şi se scot 1–2 ml sînge, care se azvîrle; se adaptează o seringă mare, cu care se scoate sîngele necesar pentru o coagulogramă. Se repartizează în două eprubete cîte 1 ml sînge şi eprubetele se pun în baie la 37°. Cronometrul se porneşte din momentul cînd sîngele pătrunde în seringă.

Din minut în minut, eprubeta nr. 1 este citită prin înclinare la 45°, cu precauţie. Timpul de coagulare este determinat în momentul cînd eprubeta poate fi complet răsturnată fără ca sîngele să se scurgă. În acest moment începe citirea eprubetei nr. 2 care, fiind lăsată nemişcată, coagulează mai tîrziu. Citirea se face tot din minut în minut. Se opreşte cronometrul cînd apare coagularea în eprubeta a doua.

La individul normal coagularea în prima eprubetă apare între 6 şi 10 minute, iar în eprubeta a doua, între 8 şi 12 minute.

Timpul de coagulare este timpul scurs de la pornirea cronometrului pînă la apariţia coagulării în eprubeta a doua.

Metode care utilizează sîngele capilar (metoda Bazarov)

Se utilizează atunci cînd recoltarea venoasă este imposibilă (nou-născut, copil).

Pe o lamă de sticlă se pune o picătură de ser fiziologic; se înţeapă pulpa degetului, se îndepărtează prima picătură, iar a doua se lasă să cadă liberă peste picătura de ser fiziologic. Se notează timpul şi se pune lama într-o cameră umedă, făcută în cutie Petri prevăzută cu hîrtie de filtru umezită. Determinarea se face la temperatura camerei. Prin înclinări uşoare din minut în minut se fac citirea şi determinarea timpului de coagulare.

Valori normale: 8–10 minute.

Valoarea determinării timpului de coagulare. Timpul de coagulare poate fi crescut în stările de hipocoagulabilitate. Această probă este puţin sensibilă şi un timp de coagulare normal nu exclude un deficit al coagulării. Este o mare greşală a se pune bază numai pe o astfel de determinare, fără a face un studiu complet al hemostazei, mai ales înainte de intervenţii chirurgicale (amigdalectomii etc.).

2. TIMPUL DE RECALCIFICARE (HOWELL)

Reactivi:

Oxalat de sodiu 1,34%
Clorură de calciu M/40

Recoltarea sîngelui. Sîngele se recoltează pe anticoagulant, oxalat de sodiu 1,34%, în condiţiile arătate pentru o recoltare standard. Se centrifughează concomitent cu proba martor normal, timp de 5 minute, la 1 500 turaţii/minut.

Tehnica. Într-o eprubetă se pune 0,2 ml plasmă şi se ţine în baie de apă la 37°. Se adaugă 0,2 ml clorură de calciu M/40, pornindu-se din acest moment cronometrul. Se fac citiri din 15 în 15 secunde, pînă la 1 minut, apoi citirile se fac din 10 în 10 secunde, prin înclinarea eprubetei scoase uşor din apă.

Coagularea este gata cînd amestecul se coagulează sub forma unui cheag opalescent compact sau, uneori, sub forma unor filamente dense de fibrină. În acest moment se opreşte cronometrul.

Valori normale: 1 minut 10 secunde, pînă la 2 minute 10 secunde.

Valoarea testului, precum şi interpretarea lui sînt identice ca pentru timpul de coagulare.

3. METODA DE COAGULARE-DILUŢIE (CHEVALLIER-FIEHRER)

Principiu. Se fac diferite diluţii ale plasmei şi se determină timpul de recalcificare al fiecărei diluţii.

Recoltarea sîngelui: recoltarea standard.

Într-o serie de eprubete se fac diluţii diferite de plasmă în ser fiziologic: 1/1 1/2 1/4 1/8 1/16

Volum final 0,2 ml.

Se măsoară timpul de recalcificare al fiecărei diluţii, adăugînd cîte 0,2 ml de clorură de calciu M/40, la 37°C.

Rezultate: se construieşte o curbă în funcţie de diluţia plasmei şi timpul respectiv.

Curba normală: plasma diluată 1/2 coagulează uneori mai rapid decît plasma nediluată 1/1, ceea ce se traduce printr-un croşet de coborîre a curbei. Acest fenomen se poate explica prin acţiunea factorilor inhibitori ai coagulării, care în plasmă nediluată pot acţiona dînd un timp de recalcificare uşor mai prelungit, spre deosebire de timpul de recalcifiere al diluţiei 1/2, în care inhibitorul, fiind slab, nu rezistă la diluţia respectivă şi acţiunea lui inhibantă se anulează, dînd naştere la o scurtare a coagulării plasmei. Timpul creşte la celelalte diluţii, datorită diluţiei factorilor de coagulare.

În caz de hipocoagulabilitate curba se situează deasupra curbei normale.

În caz de hipercoagulabilitate curba se situează, la primele 2–3 diluţii sub curba normală.

Valoare — interpretare. Testul de coagulare-diluţie dă indicaţii despre hipocoagulabilitate şi este mai puţin sensibil în studiul hipercoagulabilităţii. Valoarea lui în studiul inhibitorilor este redusă.

4. TOLERANȚA LA HEPARINĂ „IN VITRO” (SOULIER)

Principiu: se studiază timpul de recalcificare a plasmei oxalatate în prezența unor cantități de heparină.

Material necesar:

- Plasmă de cercetat oxalatată.
- Plasmă normală martor oxalatată.
- Clorură de calciu M/40.
- Heparină.
- Eprubete, pipete, baie la 37°.

Recoltarea sîngelui. Pentru toleranța la heparină, sîngele se recoltează în mod obligatoriu pe oxalat de sodiu.

Centrifugarea sîngelui se face concomitent cu proba de sînge normal martor recoltat în condiții identice, timp de 5 minute, la 1 800 ture pe minut.

Proba trebuie să se facă fără întîrziere după recoltarea sîngelui.

Se recomandă ca martorul normal să fie recoltat de la un individ de sex masculin, deoarece la femeie apar modificări de coagulabilitate în timpul ciclului menstrual.

Tehnica. Se fac diluții de heparină în soluția de clorură de calciu M/40, în așa fel încît în 0,5 ml clorură de calciu să se obțină 3 concentrații diferite de heparină:

Tubul 0 = 0,5 sol. Cl_2Ca M/40.

Tubul 1 = 0,5 sol. Cl_2Ca M/40 conținînd 0,3u. heparină.

Tubul 2 = 0,5 sol. Cl_2Ca M/40 conținînd 0,7 u. heparină.

Tubul 3 = 0,5 sol. Cl_2Ca M/40 conținînd 1 u. heparină.

Se procedează în felul următor (se întrebuințează heparina folosită în terapeutică, care conține 5 000 u./ml):

a) Heparină 0,1 ml + Cl_2Ca M/40 25 ml.

Soluția se poate conserva timp îndelungat în frigider, sau, și mai bine, în stare congelată; conține 20 unități de heparină/1 ml.

b) Soluția *a* se diluează în soluție de clorură de calciu 1/10 :1 ml soluție *a* și 9 ml clorură de calciu M/40.

Se obține soluția *b*, care conține 2 unități de heparină/1 ml, adică 1 unitate/0,5 ml de clorură de calciu (tubul nr. 3).

Tubul 2 = 0,7 soluție *b* + 0,3 clorură de calciu conține 0,7 unități/0,5 ml.

Tubul 1 = 0,3 soluție *b* + 0,7 clorură de calciu conține 0,3 unități /0,5 ml.

Cele patru tuburi (0, 1, 2, 3) sînt ținute în baie de apă la 37°.

În fiecare tub se adaugă cîte 0,5 ml plasmă de cercetat, începînd cu tubul nr. 3. Se pornește cronometrul atunci cînd se adaugă plasma în tubul 0. Tubul 0 se citește din 15 în 15 secunde și tuburile nr. 1, 2, 3 se citesc din minut în minut.

Se evită orice agitare a tuburilor, citirea făcîndu-se blînd, prin înclinare ușoară la 45°.

Momentul coagulării: *se consideră coagularea terminată atunci cînd prin răsturnarea tubului nu curge nici o serozitate.* Firele de fibrină care apar în timpul diferitelor citiri nu se iau în considerație.

Rezultate la normal:

Tubul 0: nu conține heparină, trebuie să dea un timp de recalcificare sub 2 minute 30 de secunde. Dacă dă un timp mai prelungit testul nu are valoare, fie că plasma a fost mult centrifugată și este foarte săracă în trombocite, fie condițiile de recoltare sau de recalcificare sînt greșite.

Tubul nr. 3 trebuie să dea un timp situat între 10 și 12 minute

Tubul nr. 2	6–8 minute.
Tubul nr. 1	4–5 minute.

Testul de toleranță la heparină *in vitro* este un test extrem de sensibil și necesită următoarele precauții ca să fie executat corect:

Singura condiție pentru reușita și valoarea testului este ca tubul nr. 3, care teoretic conține 1 unitate de heparină, să dea un timp de coagulare a plasmei-martor normale situat între 10 și 12 minute. Altfel testul nu are valoare.

Dat fiind că diferitele produse comerciale de heparină nu conțin decît cu aproximație numărul de unități trecut pe etichetă, diluțiile făcute în soluția de clorură de calciu nu coincid, ca să dea în tubul nr. 3 timpul de coagulare situat între 10 și 12 minute. Mai mult decît atît, chiar dacă folosim aceeași sticlă de heparină multă vreme, nu reușim ca, respectînd diluțiile, să ajungem la rezultate identice, datorită faptului că micile erori de tehnică (pipetele folosite, pipetarea) sînt în stare să modifice rezultatul.

Obiectivul principal urmărit este să se obțină cu o diluție de heparină în 0,5 ml clorură de calciu un timp de 10–12 minute, prin adăugarea de 0,5 ml plasmă normală, indiferent de concentrația teoretică a heparinei.

Pentru a obține acest rezultat, se fac întîi mai multe diluții teoretice de concentrații de heparină în 0,5 ml clorură de calciu – 0,3; 0,6; 0,8; 1 unități heparină – și se măsoară timpul de coagulare al fiecărei probe, prin adăugarea a 0,5 ml plasmă normală. Tubul care dă un timp de coagulare situat între 10 și 12 minute este valabil și cu această concentrație de heparină se va repeta proba cu plasma de cercetat.

Determinarea toleranței la heparină se reduce astfel la determinarea unei singure probe, unei singure concentrații de heparină, comparînd plasma normală (care trebuie să coaguleze în 10–12 minute) cu timpul de coagulare al plasmei de cercetat.

Practic, concentrația de heparină care dă un timp de coagulare de 10–12 minute, în condițiile arătate, este considerată ca 1 unitate de heparină.

Valoare – interpretări. În prezent, testul de toleranță la heparină este testul cu cea mai mare sensibilitate în judecarea stării de coagulabilitate globală.

Indicele de coagulabilitate: I.C.

Indicele de coagulabilitate, prin toleranță la heparină, este raportul dintre timpul de coagulare al martorului și timpul de coagulare al plasmei de bolnav, găsite în proba care conține 1 unitate de heparină la 0,5 ml soluție calcică.

$$\text{I.C.} = \frac{\text{Timp martor}}{\text{Timp bolnav}} = 0{,}80 - 1{,}20$$

Starea de izocoagulabilitate (normal): indicele este cuprins între 0,80 și 1,20.

Starea de hipocoagulabilitate: indicele este sub 0,80.

Starea de hipercoagulabilitate: indicele este peste 1,20.

Testul de toleranță la heparină este un test de mare valoare în determinarea hipercoagulabilității și a hipocoagulabilității. De asemenea, testul de toleranță la heparină, împreună cu timpul de protrombină Quick, reprezintă o metodă sigură de supraveghere a hipocoagulabilității terapeutice prin dicumarol și derivații acestuia.

Testul de toleranță la heparină decelează stări de hipocoagulabilitate fruste, care au un timp de coagulare normal; astfel de hipocoagulabilități se observă în trombopenii, în hemofilii fruste, în scăderi puțin pronunțate ale factorilor de coagulare.

Testul poate decela și urmări hipercoagulabilitatea care se instalează în perioada postoperatorie, *post partum*, la cardiaci după administrare de tonicardiace și diuretice, în cursul trombozelor arteriale și venoase etc.

Factori de eroare în determinarea toleranței la heparină:

1. Factori de hipercoagulabilitate artificială.

— Puncție venoasă incorectă, cu multe tatonări, aducînd suc tisular.

— Sîngele agitat puternic cu hemoliză.

2. Factori de hipocoagulabilitate artificială:

— Sînge citratat în loc de oxalatat.

— Centrifugare foarte rapidă.

— Tuburi agitate în timpul citirii coagulării. O retracție a cheagului prin agitare îngreunează aprecierea punctului final al coagulării, simulînd o incoagulabilitate. Deci, citirea trebuie să se facă cu manevre foarte blînde de înclinare a tuburilor.

— Recalcificare insuficientă.

— Sticlărie insuficient spălată, conținînd urme de acid.

STUDIUL HEMOSTAZEI LEGATĂ DE VAS

Studiul hemostazei legată în special de starea capilarelor se urmărește prin următoarele teste:

1. Timpul de sîngerare.
2. Rezistența capilară.
3. Retracția cheagului.
4. Studiul trombocitului.

1. TIMPUL DE SÎNGERARE (T.S.)

Materialul necesar:

— Ac Francke sau ac obișnuit.
— Vată, alcool.
— Hîrtie de filtru.
— Cronometru.

Tehnica. Se înțeapă, după dezinfectare și uscare, lobul urechii cu un ac, 3–4 mm adîncime. Se pornește cronometrul în momentul înțepării. Se absorb, cu o hîrtie de filtru, din 30 în 30 de secunde, picăturile de sînge care ies spontan fără nici o manevră de presiune. Se oprește cronometrul, cînd hîrtia de filtru nu se mai pătează de sînge.

Este necesar, în cazuri dubioase, a se repeta proba la cealaltă ureche.

Timpul de sîngerare normal: 2–4 minute.

Timpi superiori, peste 5 minute, sînt întotdeauna patologici.

Valoare — interpretare. Timpul de sîngerare explorează primii doi timpi ai hemostazei. Corect parcticat, el reflectă funcţia hemostatică a vaselor şi a trombocitelor.

Timpul se sîngerare este prelungit în atingerile vasculare izolate, în care toate celelalte teste sînt normale. Este prelungit în trombocitopenii şi în unele trombocitopatii.

Timpul de sîngerare este normal în hemofilie.

Cauzele de erori. O incizie prea mare sau prea profundă poate fi cauza unei false prelungiri a timpului de sîngerare în hipocoagulabilităţi de origine plasmatică (hemofilie).

O înţepătură prea slabă poate să ascundă o prelungire discretă a timpului de sîngerare.

O vascularizare săracă sau bogată a urechii poate determina modificări în minus sau în plus.

2. REZISTENŢA CAPILARĂ

(Proba Rumpel-Leede-Koncealovski)

Principiu. Crearea unei staze venoase favorizează extravazarea eritrocitelor prin endoteliul capilar în ţesutul subcutanat.

Metoda prin compresiune. Semnul garoului constă în aplicarea unui garou pe braţ, cu ajutorul unei pense hemostatice, la început strîns, pînă ce dispare pulsul arterial, apoi imediat lărgit, pînă ce reapare pulsul arterial; în acest moment se fixează garoul pentru 10 minute. Presiunea făcută de garou se situează în acest fel între presiunea arterială maximă şi cea minimă.

Mai comod, compresiunea pe braţ se poate face cu manşeta aparatului de tensiune, menţinînd acul între presiunea maximă şi minimă, fixat timp de 10 minute.

Citirea. Se măsoară timpul de apariţie a primelor peteşii sau numărul de peteşii vizibile în primele 5—6 minute. *La indivizii normali* apar uneori peteşii în număr mic, pînă la 5—8, dar după 5—6 minute de aplicare a compresiunii. În cazuri patologice numărul de peteşii este foarte mare şi ele apar înainte de 5 minute (rezistenţă capilară scăzută). Dacă peteşiile apar după 5 minute, dar în număr mare, rezistenţa este de asemenea scăzută.

Nu se socotesc peteşiile apărute la contactul garoului sau aparatului de tensiune cu pielea.

Metoda prin depresiune se practică cu ajutorul unei ventuze de sticlă de 2 cm diametru, prevăzută cu o pompă aspiratoare de mînă, care este cuplată cu un manometru de mercur sau metalic ce indică gradul vidului.

Rezistenţa capilară se măsoară în regiunea plicei cotului, pe o suprafaţă plană. Se aplică ventuza, se face vid timp de 60 de secunde, la 25 cm de mercur. Se repetă operaţia la cîţiva centimetri de primul loc sau schimbînd braţul, făcînd o depresiune la 20, 15 şi 10 cm de mercur.

Capilarele au o *rezistenţă normală*, dacă rezistă (lipsă de peteşii) la o depresiune de 20—25 cm de mercur la indivizii adulţi şi de 30 cm mercur la copii.

Cînd apar peteşii la o depresiune de 20 cm de mercur (indivizi adulţi) însemnează că rezistenţa este scăzută şi este necesar să se determine depresiunea minimă la care apar peteşiile: 15, 10 cm de mercur. Nu se socotesc peteşiile apărute la contactul buzelor ventuzei cu pielea.

Rezistenţa capilară măsurată prin depresiune este mai scăzută în regiunea subclaviculară. La femeie este mai scăzută decît la bărbat, la adult mai scăzută decît la copil şi sugar.

Valoare-interpretare. Rezistenţa capilară este scăzută în trombocitopenii, în majoritatea trombocitopatiilor, în avitaminozele C şi P. Există şi cazuri de diminuare a rezistenţei capilare, aşa-zisă idiopatică, deseori cu caracter familial.

De asemenea, rezistenţa capilară este scăzută la hepatici, la hipertensivi, la uremici, la diabetici.

3. RETRACŢIA CHEAGULUI

Se introduc într-o eprubetă 5 ml sînge recoltat prin puncţie venoasă şi se pune imediat în baie de apă la 37°. Se citeşte retracţia cheagului după 2—3 ore, apreciind cantitatea de ser.

În mod *normal*, după 3 ore, cantitatea de ser reprezintă 30% pînă la 50% din volumul total al sîngelui.

Pentru ca dezlipirea cheagului de pe sticlă să se facă spontan se recomandă ca eprubetele folosite în această probă să fie sterilizate prin autoclavare şi nu la căldură uscată.

În caz cînd cheagul nu se dezlipeşte spontan, după 30 sau 60 de minute de la recoltare, trebuie dezlipit prin introducerea unei pipete Pasteur, închise la vîrf, între sticlă şi cheag, uşor, fără a secţiona cheagul.

Retracţia cheagului este nulă sau incompletă în trombopenii, în unele trombopatii şi în poliglobulii (determinarea hematocritului prezintă importanţă deosebită în interpretare).

Retracţia cheagului variază în funcţie de cifra de eritrocite şi cantitatea de fibrinogen, care modifică cheagul în ceea ce privește volumul lui. Funcțional însă, retracția depinde de starea calitativă și cantitativă a trombocitelor.

Cauzele de erori. False iretractibilități ale cheagului pot surveni datorită expunerii la temperatură scăzută sau lipirii cheagului de pereții sticlei.

4. STUDIUL TROMBOCITULUI

a) *Studiul morfologic* cuprinde :

— numărătoarea de trombocite;

— aspectul morfologic : talie, colorabilitate, aspectul și dispoziția cromomerului;

— studiul megacariogramei.

b) *Studiul funcțional* privește :

— aglutinabilitatea spontană a trombocitelor;

— adezivitatea; retracția cheagului;

— testul de consum de protrombină;

— testul trombocitar de generare a tromboplastinei.

STUDIUL PRIMEI FAZE A COAGULĂRII

Testele primei faze a coagulării cuprind studiul activității factorului 3 trombocitar și tromboplastinelor plasmatice A, B și C :

1. Consumul de protrombină.

2. Cercetarea tromboplastinelor plasmatice : determinarea tipului de hemofilie.

3. Testul de generare a tromboplastinei.

4. Cercetarea factorului 3 trombocitar.

5. Timpul de cefalină.

6. Studiul trombocitului.

1. CONSUMUL DE PROTROMBINĂ

Principiu. După coagularea sîngelui, protrombina se transformă în trombină. În mod normal în ser mai rămîne, după 4 ore, o cantitate de aproximativ 10% protrombină, denumită protrombină reziduală. Testul titrează această protrombină reziduală din ser.

Materialele necesare — Reactivi :

— Serul de cercetat și serul martor normal.

— Plasmă adsorbită pe sulfat de bariu.

— Tromboplastină.

— Clorură de calciu M/40.

Recoltarea sîngelui. Sîngele se recoltează fără anticoagulant, în eprubete întotdeauna de același calibru de 10/100 mm; cantitatea necesară este de 4—5 ml (acest sînge se folosește atît pentru retracția cheagului, cît și pentru consumul de protrombină).

Eprubeta cu sînge se pune imediat în baie de apă la 37°, unde trebuie să stea timp de 4 ore. În acest timp, dacă cheagul nu s-a dezlipit spontan, se va proceda la dezlipirea lui. După 4 ore se citește retracția cheagului. Se decantează serul într-o eprubetă de centrifugă și se centrifughează puternic.

Se repartizează în eprubete de coagulare cîte 0,1 ml ser pentru proba propriu-zisă, iar eprubetele se pun în baie de apă la 37°, timp de 15 minute, pentru inactivarea trombinei.

Tehnica. Se amestecă :

Ser de cercetat	0,1 ml
Tromboplastină calcică	0,2 ml
Se lasă 60 de secunde, apoi	se adaugă :
Plasmă adsorbită	0,1 ml

Peste 0,1 ml ser de cercetat se adaugă 0,2 ml tromboplastină calcică (tromboplastină 1 volum + clorură de calciu M/40 1 volum).

Din mometul cînd se adaugă tromboplastina calcică se pornește cronometrul. Totul stă în baie de apă la 37°, timp de 60 de secunde foarte precis. Exact la 60 de secunde se adaugă în eprubetă 0,1 ml plasmă adsorbită. Din acest moment se măsoară timpul de consum al protrombinei : se urmărește apariția unui cheag, momentul de apariție a cheagului reprezentînd timpul testului.

Mecanismul reacției. Sub influența tromboplastinei calcice, protrombina reziduală din ser se transformă în trombină, în timp de 60 de secunde. Trombina, acționînd asupra plasmei adsorbite, o coagulează cu atît mai repede cu cît cantitatea de protrombină reziduală transformată în trombină este mai mare.

Plasma adsorbită are numai rolul de a aduce fibrinogenul, suportul coagulării. Reacția se poate face și cu fibrinogen, ca reactiv, în loc de plasmă adsorbită.

Condiția importantă este ca acești reactivi, atît plasma adsorbită, cît și fibrinogenul, să fie lipsiți de protrombină.

Valoare-interpretare. Valorile normale sînt cuprinse între 40 și 90 de secunde.

Timpul de consum de protrombină al unui ser normal, după 4 ore de incubare la 37°, trebuie judecat în funcție și de activitatea tromboplastinei folosite în reacție. O tromboplastină cu activitate puternică poate să dea un timp mai scurt și, invers, o tomboplastină slabă dă un timp mai lung.

modifică cheagul în ceea ce privește volumul lui. Funcțional însă, retracția depinde de starea calitativă și cantitativă a trombocitelor.

Cauzele de erori. False iretractibilități ale cheagului pot surveni datorită expunerii la temperatură scăzută sau lipirii cheagului de pereții sticlei.

4. STUDIUL TROMBOCITULUI

a) *Studiul morfologic* cuprinde :

— numărătoarea de trombocite;

— aspectul morfologic : talie, colorabilitate, aspectul și dispoziția cromomerului;

— studiul megacariogramei.

b) *Studiul funcțional* privește :

— aglutinabilitatea spontană a trombocitelor;

— adezivitatea; retracția cheagului;

— testul de consum de protrombină;

— testul trombocitar de generare a tromboplastinei.

STUDIUL PRIMEI FAZE A COAGULĂRII

Testele primei faze a coagulării cuprind studiul activității factorului 3 trombocitar și tromboplastinelor plasmatice A, B și C :

1. Consumul de protrombină.
2. Cercetarea tromboplastinelor plasmatice : determinarea tipului de hemofilie.
3. Testul de generare a tromboplastinei.
4. Cercetarea factorului 3 trombocitar.
5. Timpul de cefalină.
6. Studiul trombocitului.

1. CONSUMUL DE PROTROMBINĂ

Principiu. După coagularea sîngelui, protrombina se transformă în trombină. În mod normal în ser mai rămîne, după 4 ore, o cantitate de aproximativ 10% protrombină, denumită protrombină reziduală. Testul titrează această protrombină reziduală din ser.

Materialele necesare — Reactivi :

— Serul de cercetat și serul martor normal.

— Plasmă adsorbită pe sulfat de bariu.

— Tromboplastină.

— Clorură de calciu M/40.

Recoltarea sîngelui. Sîngele se recoltează fără anticoagulant, în eprubete întotdeauna de același calibru de 10/100 mm; cantitatea necesară este de 4—5 ml (acest sînge se folosește atît pentru retracția cheagului, cît și pentru consumul de protrombină).

Eprubeta cu sînge se pune imediat în baie de apă la 37°, unde trebuie să stea timp de 4 ore. În acest timp, dacă cheagul nu s-a dezlipit spontan, se va proceda la dezlipirea lui. După 4 ore se citește retracția cheagului. Se decantează serul într-o eprubetă de centrifugă și se centrifughează puternic.

Se repartizează în eprubete de coagulare cîte 0,1 ml ser pentru proba propriu-zisă, iar eprubetele se pun în baie de apă la 37°, timp de 15 minute, pentru inactivarea trombinei.

Tehnica. Se amestecă :

Ser de cercetat	0,1 ml
Tromboplastină calcică	0,2 ml
Se lasă 60 de secunde, apoi	se adaugă :
Plasmă adsorbită	0,1 ml

Peste 0,1 ml ser de cercetat se adaugă 0,2 ml tromboplastină calcică (tromboplastină 1 volum + clorură de calciu M/40 1 volum).

Din mometul cînd se adaugă tromboplastina calcică se pornește cronometrul. Totul stă în baie de apă la 37°, timp de 60 de secunde foarte precis. Exact la 60 de secunde se adaugă în eprubetă 0,1 ml plasmă adsorbită. Din acest moment se măsoară timpul de consum al protrombinei : se urmărește apariția unui cheag, momentul de apariție a cheagului reprezentînd timpul testului.

Mecanismul reacției. Sub influența tromboplastinei calcice, protrombina reziduală din ser se transformă în trombină, în timp de 60 de secunde. Trombina, acționînd asupra plasmei adsorbite, o coagulează cu atît mai repede cu cît cantitatea de protrombină reziduală transformată în trombină este mai mare.

Plasma adsorbită are numai rolul de a aduce fibrinogenul, suportul coagulării. Reacția se poate face și cu fibrinogen, ca reactiv, în loc de plasmă adsorbită.

Condiția importantă este ca acești reactivi, atît plasma adsorbită, cît și fibrinogenul, să fie lipsiți de protrombină.

Valoare-interpretare. Valorile normale sînt cuprinse între 40 și 90 de secunde.

Timpul de consum de protrombină al unui ser normal, după 4 ore de incubare la 37°, trebuie judecat în funcție și de activitatea tromboplastinei folosite în reacție. O tromboplastină cu activitate puternică poate să dea un timp mai scurt și, invers, o tomboplastină slabă dă un timp mai lung.

Un timp prelungit nu prezintă nici o semnificație deosebită, se poate întîlni des la normal și nu denotă altceva decît un consum mare al protrombinei. Totuși putem întîlni timpul de consum de protrombină prelungit în cazul prezenței de anticoagulanți circulanți de tip antitrombină (a vedea capitolul respectiv).

Un timp scurtat indică o insuficientă transformare a protrombinei în trombină, rămînînd o mare cantitate de protrombină reziduală. Aceasta denotă o tulburare în formarea tromboplastinei endogene active, datorită deficienței factorilor care intervin în formarea ei.

Afecțiunile la care timpul de consum de protrombină este scurtat (deficitar) sînt:

– hemofiliile, indiferent de tip: timpul este foarte scurtat, între 5 și 15 secunde, uneori sub 5 secunde;

– trombocitopenii, trombocitopatii (deficiență în factorul 3 trombocitar); în general, se întîlnesc timpi de 20–30 de secunde. În cazuri cu trombocitopenii mai accentuate se pot întîlni și timpi mai scurți de 10–15 secunde;

– deficiențele în proaccelerină și în factor Stuart, se însoțesc, de asemenea, de o scurtare a timpului de consum, acești factori intervenind amîndoi în formarea tromboplastinei endogene active.

2. CERCETAREA TROMBOPLASTINELOR PLASMATICE

(Determinarea tipului de hemofilie)

Principiu. Se corectează timpul de coagulare a sîngelui integral sau timpul de recalcifiere a plasmei bolnavului cu diferiți reactivi cunoscuți, conținînd sau nu factori antihemofilici.

Corectarea timpului de coagulare a sîngelui integral. Se pregătesc următorii reactivi:

a) Plasmă normală proaspătă: conține toți factorii antihemofilici A + B + C.

b) Plasmă normală adsorbită: conține factorii A + C (B este adsorbit).

c) Ser normal de 3–4 zile vechime.

În 3 eprubete se pun cîte 0,1 ml din fiecare reactiv. Se recoltează sîngele venos de la bolnav în condițiile standard arătate. Cu o pipetă gradată se adaugă în fiecare eprubetă cu reactiv cîte 1 ml sînge, iar 1 ml sînge se pune într-o eprubetă goală, lipsită de orice reactiv. Totul se efectuează în baie de apă la 37° și se urmărește din minut în minut timpul de coagulare al celor 4 eprubete.

Corectarea timpului de recalcifiere a plasmei de bolnav. Se pregătesc aceiași reactivi a, b, c, descriși pentru corectarea timpului de coagulare a sîngelui integral.

În 3 eprubete se pun cîte 0,02 ml din fiecare reactiv. Se adaugă în fiecare eprubetă cu reactiv cîte 0,18 ml plasmă oxalatată de la bolnav, iar 0,2 ml din această plasmă se pun într-o eprubetă lipsită de reactiv. În toate cele 4 eprubete se adaugă cîte 0,2 ml clorură de calciu M/40. Toate operațiile se efectuează în baie de apă la 37°. Se urmărește timpul de recalcifiere din 30 în 30 de secunde.

TABELUL 85

Determinarea tipului de hemofilie prin corectarea timpului de coagulare a sîngelui integral sau a plasmei recalcifiate

Tipul de hemofilie	Reactivi		
	Plasmă normală proaspătă	Plasmă normală adsorbită	Ser normal de 3–4 zile
Hemofilie A	Corectează	Corectează	Nu corectează
Hemofilie B	Corectează	Nu corectează	Corectează
Hemofilie C	Corectează	Corectează	Corectează

Exemplu: hemofilie de tip A:

a) *Prin corectarea timpului de coagulare*:

— timpul de coagulare: 70 de minute;

— corectarea cu plasmă normală proaspătă: 10 minute;

— corectarea cu plasmă normală adsorbită: 12 minute;

— corectarea cu ser normal de 3–4 zile: 60 de minute.

b) *Prin corectarea timpului de recalcifiere*:

— timpul de recalcifiere: 8 minute;

— corectare cu plasmă normală proaspătă: 2 minute și 30 de secunde;

— corectare cu plasmă normală adsorbită: 3 minute și 30 de secunde;

— corectare cu ser normal de 3–4 zile: 6 minute.

Determinarea tipului de hemofilie prin corectările făcute asupra timpului de coagulare sau a timpului de recalcifiere sînt posibile atunci cînd timpul de coagulare și timpul de recalcifiere ale bolnavului sînt destul de prelungite pentru a avea un rezultat net.

Sînt însă cazuri de hemofilie cu acești timpi aproape de normal sau chiar în zona timpilor normali (hemofilii fruste, cazuri de remisiuni spontane) a căror determinare de tip nu se poate realiza cu aceste tehnici. Diagnosticarea tipului de hemofilie în astfel de împrejurări se poate face prin corectarea timpului de consum de protrombină, dar mai ales cu testul de generare al tromboplastinei.

Determinarea tipului de hemofilie prin corectarea consumului de protrombină a sîngelui de bolnav. Se lucrează în condiţii identice de corectare a timpului de coagulare a sîngelui integral sau a timpului de recalcifiere a plasmei, menţionate în tehnicele precedente. Se determină consumul de protrombină în toate cele 4 eprubete care au servit la corectarea sîngelui integral, după o incubare de 4 ore la 37°.

Se constată, în caz de corectare, o revenire la normal a timpului de consum de protrombină faţă de martorul necorectat, care are un timp foarte scurt.

Determinarea consumului de protrombină se poate face şi cu eprubetele care au servit la corectarea timpului de recalcifiere, după o incubare de 30—60 de minute la 37°.

În funcţie de reactivul folosit şi corectarea obţinută se poate afla tipul de hemofilie.

Schemă de corectare a consumului de protrombină

Eprubeta	1	2	3	4
Plasmă de cercetat	0,4	0,4	0,4	0,4
Cefalină	0,1	—	—	—
Plasmă adsorbită	—	0,1	—	—
Ser vechi lipsit de protrombină diluat 1/5	—	—	0,1	—
Ser fiziologic	—	—	—	0,1
Cl_2Ca M/10	2 pic.	2 pic.	2 pic.	2 pic.

Amestecul plasmei de cercetat cu cei trei reactivi se lasă un timp de 10 minute la 37°, apoi se adaugă în fiecare eprubetă cîte 2 picături de Cl_2Ca M/10.

După o oră de la coagularea plasmei se îndepărtează cheagurile fără să fie strivite. Serurile se mai lasă încă 1 oră în baia de 37°. Apoi se procedează la detrminara consumului de protrombină în serul din fiecare eprubetă. Timpul de consum de protrombină din primele trei eprubete se compară cu timpul eprubetei 4, care reprezintă consumul plasmei de cercetat necorectată. În funcţie de corectarea făcută se poate deduce tipul de hemofilie. Cefalina produce corectarea timpului în caz de deficienţe trombocitare.

3. TESTUL DE GENERARE A TROMBOPLASTINEI

(Biggs şi Douglas)

Principiu. Acest test permite de a măsura formarea tromboplastinei endogene active în prezenţa următorilor factori :

— antihemofilici A, B şi C ;

— 3 trombocitar ;

— proaccelerină şi factorul Stuart.

Reactivi :

Se prepară 5 reactivi :

1. Suspensie de trombocite.
2. Plasmă lipsită de trombocite.
3. Plasmă adsorbită.
4. Ser de 24 de ore.
5. Clorură de calciu M/40.

Suspensia de trombocite. Se recoltează sîngele cu citrat de sodiu 3,8% în proporţie obişnuită, folosind material siliconat (ace, seringi, eprubete). Se centrifughează imediat timp de 15 minute la 800 ture/min., la temperatura de +4°. Cu o pipetă siliconată de separă imediat plasma şi se centrifughează la 6 000 de ture/min timp de 20 de minute. Plasma supernatantă se decantează imediat ; aceasta reprezintă *plasma lipsită de trombocite* folosită la toate probele ca plasmă substrat.

Trombocitele rămase în sedimentul eprubetei se spală de două ori cu ser fiziologic, amestecînd de fiecare dată cu o baghetă de lemn pentru a reface suspensia. După ultima spălare, trombocitele se resuspendă într-un volum de ser fiziologic egal cu o treime din volumul iniţial al plasmei.

Pentru prepararea plasmei lipsită de trombocite şi a suspensiei de trombocite fără material siliconat, noi recomandăm următoarea modificare a tehnicii :

Se recoltează sînge pe anticoagulant în 2 eprubete parafinate, cîte 5 ml în fiecare. Una din eprubete este centrifugată la 800 ture/min. timp de 15 minute, la temperatura laboratorului (dacă se poate la +4°). Se decantează plasma într-o eprubetă şi se centrifughează apoi la turaţie mare pentru sedimentarea spălarea şi resuspendarea trombocitelor, ca în prima tehnică : se obţine astfel suspensia de trombocite. A doua eprubetă se centrifughează imediat după recoltare la turaţia maximă 3 000 ture/min., timp de 30 de minute (sau 6 000 ture timp de 20 de minute). Se decantează plasma: aceasta reprezintă plasma lipsită de trombocite.

Plasma adsorbită cu sulfat de bariu se diluează, la intrebuinţare, 1/5 cu ser fiziologic; aceasta are rolul de a aduce factorii antihemofilici A şi C şi proaccelerină.

Ser proaspăt de 24 de ore. Se recoltează sîngele fără anticoagulant. După coagulare şi retracţia cheagului se decantează serul şi se centrifughează. Se lasă 24 de ore la temperatura camerei, pentru inactivarea trombinei.

Înainte de lucru, serul se diluează 1/10 în ser fiziologic.

Serul proaspăt aduce factorii antihemofilici B şi C şi factorul Stuart.

Clorura de calciu M/40 este al cincelea reactiv folosit.

Toţi aceşti reactivi se prepară atît din sîngele de la un individ normal, cît şi din sîngele de la bolnavul cercetat, afară de plasma substrat, lipsită de tombocite, care se prepară din sîngele normal.

Cînd se studiază factorul trombocitar şi bolnavul are un număr scăzut sau crescut de trombocite se va aranja prin tatonare ca suspensia de trombocite provenind de la bolnav să conţină pe mm^3 acelaşi număr de trombocite ca şi suspensia normală.

Tehnica. Se pun în 8 eprubete numerotate de la 1 la 8 cîte 0,1 ml plasmă substrat lipsită de trombocite; toate sînt puse într-un stativ, la 37° în baia de apă. Într-o eprubetă mai mare se face mixtura de incubaţie compusă în părţi egale din:

- suspensie trombocitară 0,3 ml;
- plasmă adsorbită diluată 1/5 0,3 ml;
- ser de 24 ore diluat 1/10 0,3 ml;
- clorură de calciu M/40 0,3 ml.

Din momentul cînd s-a adăugat clorura de calciu în mixtură, se porneşte cronometrul. După un minut de incubaţie se ia cu o pipetă 0,1 ml mixtură şi cu altă pipetă 0,1 ml Cl_2Ca M/40 şi se suflă amîndouă o dată în eprubeta nr.1 cu plasmă substrat. Un ajutor cronometrează timpul de apariţie a coagulării în eprubeta nr. 1. Se repetă operaţia din minut în minut suflînd de fiecare dată 0,1 ml mixtură şi 0,1 ml Cl_2Ca în eprubetele cu plasmă substrat.

Cu un sînge normal, generarea tromboplastinei atinge punctul de activitate maximă la 4–5 minute de incubaţie a mixturei care coagulează substratul în aproximativ 10 secunde. Timpii de coagulare a substratului în funcţie de timpul de incubaţie dau o curbă care defineşte tromboplastinoformarea endogenă.

TABELUL 86

Curba martor de generare a tromboplastinei

Eprubete cu plasmă substrat (nr.)	1	2	3	4	5	6	7	8
Timpul de coagulare (în secunde)	80	60	30	12	10	10	10	10
Timpul de incubaţie a mixturei (în minute)	1	2	3	4	5	6	7	8

Cercetarea bolnavului.

a) *Diagnosticul unei deficienţe plasmatice* (lipsa de factor A sau V). Se înlocuieşte în mixtura martor plasma adsorbită cu plasma adsorbită a bolnavului, restul rămînînd neschimbat. Se repetă determinarea cu noua mixtură.

Dacă curbele se suprapun cu curba martor, bolnavul nu prezintă nici o deficienţă în factor A şi în proaccelerină.

Dacă timpii de coagulare a substratului sînt prelungiţi, este vorba de o deficienţă, fie în factor A, fie în proaccelerină. Diagnosticul se tranşează prin determinarea diferenţială a accelerinei.

b) *Diagnosticul unei deficienţe în factor B sau factor Stuart* (ser ca reactiv). Se înlocuieşte în mixtura martor serul normal cu serul bolnavului, restul rămînînd neschimbat. Se repetă determinarea cu noua mixtură.

Dacă curbele se suprapun cu curba martor, bolnavul nu prezintă nici o deficienţă serică în factor B sau factor Stuart.

Dacă timpii de coagulare a substratului sînt prelungiţi, atunci poate fi vorba de o deficienţă în factor B sau în factor Stuart. Se determină factorul Stuart sau timpul de protrombină Quick, care este prelungit în deficienţă de factor Stuart şi normal în hemofilia B.

c) Pentru cercetarea unei *deficienţe calitative trombocitare* se va repeta testul înlocuind în mixtura martor suspensia de trombocite cu suspensia de cercetat, avînd grijă de a avea, prin tatonare, acelaşi număr de trombocite ca şi la martor.

d) *Diagnosticul unei hemofilii de tip C.* Factorul C fiind prezent atît în plasma adsorbită, cît şi în ser, pentru a pune în evidenţă un astfel de deficit, se va înlocui concomitent, în mixtura martor, atît plasma adsorbită, cît şi serul cu plasma adsorbită şi serul bolnavului. Numai aşa se poate pune în evidenţă tulburarea în tromboplastinoformare, în hemofilia de tip C (sindromul Rosenthal).

Testul de generare a tromboplastinei cu reactivii bolnavului, puşi rînd pe rînd în reacţie, se poate face numai cu o singură probă, aceea care la timpul de incubaţie a mixturei martor corespunde la stabilizarea timpului între 9 şi 11 secunde, fără să se repete reacţia din minut în minut; de exemplu, după 4 sau 6 minute de incubaţie se face o singură determinare, timpul comparîndu-se cu mixtura martor la acelaşi minut de incubaţie.

4. CERCETAREA FACTORULUI 3 TROMBOCITAR

Principiu. Se prepară o suspensie trombocitară cu număr cunoscut de trombocite, care se adaugă peste o plasmă lipsită de trombocite. Timpul de recalcifiere a acestei plasme va fi în funcţie de activitatea tromboplastinei trombocitare adăugată.

Reactivi:

— Suspensie de trombocite de bolnav recoltate, preparate şi spălate în condiţii identice ca pentru testul de generare a tromboplastinei. Trombocitele se resuspendă în ser fiziologic, astfel încît să conţină 300 000 trombocite/mm^3 cifră obţinută prin cîteva tatonări.

— Suspensie de trombocite de martor normal, preparată identic ca suspensia de la bolnav.

— Plasmă normală lipsită de trombocite, obţinută din plasma normală care a furnizat suspensia de trombocite.

— Soluţie de clorură de calciu M/40.

Tehnica. Se măsoară timpul de recalcifiere a următorului amestec, la baie de apă 37° :

Plasmă normală lipsită de trombocite 0,1 ml;
Suspensie de trombocite de bolnav 0,1 ml;
Clorură de calciu M/40 0,1 ml.

Se repetă determinarea, folosind suspensie de trombocite de martor normal.

Interpretare. Dacă timpul de recalcifiere a sistemului în care s-a folosit suspensia de trombocite de bolnav este mai lung decît a sistemului cu trombocite normale înseamnează că activitatea tromboplastinică a trombocitelor de bolnav este defectuoasă.

Acest test scoate în evidenţă o deficienţă funcţională a trombocitelor (trombocitopatii).

5. TIMPUL DE CEFALINĂ

Prepararea cefalinei

Un gram de extract acetonat de creier uman (pudră de tromboplastină) se amestecă cu 50 ml cloroform. Se agită încontinuu, timp de 30 de minute la temperatura camerei. Se filtrează şi filtratul se evaporă la 56°. Reziduul de culoare brună se reia în 50 ml ser fiziologic dînd suspensie lăptoasă, omogenă care se conservă în congelator la —20°.

Se caută diluţia optimă de cefalină pentru a obţine o scurtare maximă a timpului de recalcifiere a unei plasme normale deplachetizate.

Timpul de cefalină este un timp de recalcifiere a plasmei în prezenţa cefalinei.

Reactivi: — cefalină;
— plasmă martor normal;
— plasmă de cercetat;
— ser fiziologic.

Tehnică: atît sîngele de cercetat, cît şi sîngele martor normal se recoltează pe citrat trisodic. Imediat după recoltare se centrifughează la 5 000 ture/min., timp de 15 minute.

Se alege diluţia de cefalină care dă cel mai scurt timp cu plasma normală.

Plasmă de cercetat	0,1
Cefalină în diluţie optimă	0,1
Clorură de calciu M/40	0,1

Se repetă proba cu plasma martor şi o probă se face cu ser fiziologic în locul cefalinei, atît pentru plasma de cercetat, cît şi pentru plasma martor.

Timpul de cefalină normal variază cu activitatea produsului, în medie fiind de 50 de secunde pînă la 90 de secunde.

Timpul de cefalină este normal în deficienţele protromboplastice trombocitare cantitative sau calitative (trombopenii şi trombopatii) şi este prelungit în deficienţele în factori plasmatici.

6. STUDIUL TROMBOCITULUI

A fost descris în studiul hemostazei legată de vas.

STUDIUL FAZEI A DOUA A COAGULĂRII

Studiul fazei a doua a coagulării cuprinde activitatea complexului protrombinic :

1. Timpul de protrombină Quick: determinarea activităţii complexului protrombinic.

2. Determinări diferențiale ale factorilor complexului protrombinic.

a) Determinarea protrombinei.
b) Determinarea proaccelerinei.
c) Determinarea proconvertinei.
d) Determinarea protrombinei-proconvertinei.
e) Determinarea complexului proconvertină-Stuart.

1. TIMPUL DE PROTROMBINĂ QUICK

Principiu. În prezența tromboplastinei tisulare și a clorurii de calciu, plasma normală se coagulează într-un timp foarte scurt, de 10 secunde, ocolind prima fază a coagulării.

Reactivi:

- Oxalat de sodiu 1,34 g%.
- Tromboplastină.
- Clorură de calciu M/40.

Se prepară tromboplastină calcică, amestecînd în părți egale soluția de tromboplastină cu clorură de calciu M/40.

Tehnica. Se recoltează sîngele de cercetat pe oxalat de sodiu : 9 părți sînge pentru o parte oxalat. Se centrifughează la 1 500 ture/min., timp de 5 minute. Se recoltează și sînge martor normal, în condiții identice.

Toți reactivii și plasma decantată sînt ținuți în baie de apă la 37°. Într-o eprubetă ținută în baie la 37° se introduc :

Plasmă	0,1 ml
Tromboplastină calcică	0,2 ml.

Din momentul adăugării tromboplastinei calcice se cronometrează timpul. Se face o primă citire la 5 secunde, a doua citire la 10 secunde, scoțînd eprubeta repede din apă și înclinînd-o în așa fel încît conținutul să se prelingă ușor pe peretele sticlei. După a doua citire, citirile se repetă aproximativ din două în două secunde și cronometrul se oprește, cînd se constată apariția cheagului. Prima determinare este o determinare de orientare; se fac 2—3 determinări care permit determinarea exactă a timpului de protrombină Quick.

În mod obligatoriu se face concomitent și o determinare a unei plasme martor normal, cu care de fapt se începe.

Valori normale. Timpul de protrombină Quick a unei plasme normale este în funcție de activitatea tromboplastinei. Se admite pentru lucru o tromboplastină care dă un timp de protrombină între 10 și 18 secunde.

Micrometodă pentru timpul de protrombină Quick pe sînge total capilar (Soulier)

Această metodă se folosește la nou-născut, la sugar sau copil mic, la care puncția venoasă este mai dificilă ; reprezintă o probă de orientare. Se lucrează pe sînge total, capilar.

Materialul și reactivii necesari:

- Tromboplastină.
- Lame.
- Ac.

Tehnica. Pe o lamă de sticlă perfect curată se pune o picătură mare de tromboplastină. Se înțeapă degetul mare al piciorului sau călcîiul și se ia cu vîrful unei lame o picătură de sînge aproximativ egală cu picătura de tromboplastină, amestecînd-o cu aceasta. Din momentul cînd ambele picături intră în contact, se pornește cronometrul, iar cu vîrful lamei, rapid se rotunjește și se lărgește suprafața amestecului de picături. Se imprimă lamei o rotație uniformă circulară. Coagularea se notează în momentul cînd picătura se imobilizează. Determinarea se repetă de 2—3 ori cu sînge de bolnav și de 2—3 ori cu sînge martor normal.

Variațiile sînt paralele cu cele constatate cu timpul Quick.

Timpul dat de această micrometodă variază în funcție de activitatea tromboplastinei. Se va folosi o tromboplastină care dă, la temperatura ordinară, un timp sub 25 de secunde.

Valoare-interpretări. Timpul de protrombină Quick nu reflectă numai modificările protrombinei, ci și variațiile tuturor factorilor complexului protrombinic. Denumirea de timp de protrombină rămîne mai departe, fiind o denumire mult folosită în practică, deși improprie. Pentru a-l deosebi de determinarea diferențială, acest timp de protrombină trebuie denumit «timpul de protrombină Quick».

Prin adaosul tromboplastinei tisulare în reacție, timpul de protrombină Quick ocolește prima fază a coagulării. Orice deficiență care interesează factorii primei faze a coagulării nu poate fi decelată de această probă. Astfel, în hemofilie și în afecțiunile trombocitare, acest test este normal. Timpul de protrombină Quick explorează coagularea extrinsecă.

Deficiențele care interesează factorii fazei a doua a coagulării dau un timp de protrombină Quick prelungit : în hipoprotrombinemii, hipoproconvertinemii, hipoaccelerinemii și în scăderile factorului Stuart.

Un timp de protrombină Quick prelungit se poate constata și în următoarele cazuri: anticoagulanți circulanți îndreptați asupra factorilor complexului protrombinic, anticoagulanți de tip antitrombină, în afibrinogenemii.

Exprimarea valorilor timpului de protrombină Quick

Indicele de protrombină este raportul între timpul martorului pe timpul bolnavului, înmulțit cu 100.

$$I.P. = \frac{\text{Timpul martor}}{\text{Timpul bolnav}} \times 100$$

Indicele de protrombină este o cifră relativă, convențională care nu redă fidel adevăratele variații, de aceea în practică trebuie părăsită exprimarea în indice.

Procente de protrombină. Exprimarea rezultatelor în procente față de normal reprezintă singura metodă care dă o imagine reală asupra variațiilor.

Construirea curbei de diluții a plasmei normale. Pentru exprimarea rezultatelor în procente se construiește o curbă de diluții succesive a unei plasme normale diluată din 10 în 10: 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10% plasmă. Diluțiile se pot face în ser fiziologic sau mai corect în soluție de fibrinogeu 3‰.

Cu fiecare diluție de plasmă se face un timp de protrombină Quick și se notează timpul care corespunde fiecăreia.

Dacă pentru plasma normală nediluată timpul este, de exemplu, 12 secunde, acest timp reprezintă o proporție de 100% protrombină. Pentru un timp dublu, de 24 de secunde, curba arată un procent de protrombină situat între 20 și 30. Restul timpilor dau procentele intermediare.

Această curbă rămîne valabilă numai pentru o tromboplastină care cu plasma normală nediluată dă 12 secunde. Dacă se schimbă activitatea tromboplastinei, trebuie construită altă curbă.

Pentru determinarea procentului de protrombină a plasmei de bolnav se procedează în felul următor: se determină timpul de protrombină Quick al plasmei de bolnav; timpul găsit se raportează pe curba de diluții și se poate găsi punctul corespunzător de pe curbă care arată procentul în protrombină a plasmei de bolnav.

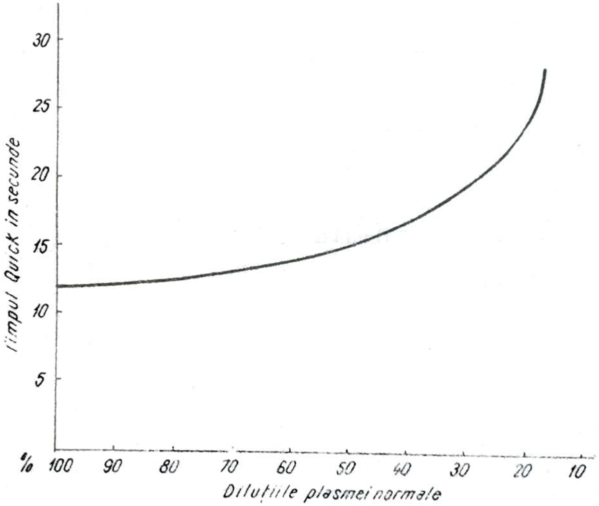


Fig. 196. — Curba de diluție a plasmei normale.

2. DETERMINĂRI DIFERENŢIALE ALE FACTORILOR COMPLEXULUI PROTROMBINIC

Principii generale

– Se realizează un amestec al tuturor factorilor cu excepţia celui care se determină. În aceste condiţii, variaţiile timpului de coagulare depind numai de factorul cercetat.

– Plasma de cercetat se foloseşte diluată 1/10 în tampon veronal-acetat sau în soluţie izotonică de clorură de sodiu. Diluţia pune mai bine în evidenţă deficienţele mici.

– Toate determinările sînt făcute comparativ cu o plasmă martor normal.

– Timpii obţinuţi se pot converti în procente cu ajutorul curbelor de diluţii efectuate pentru fiecare factor.

a) Determinarea protrombinei singure

Reactivi:

– Plasmă normală adsorbită cu sulfat de bariu: sursă de fibrinogen şi proaccelerină.

– Ser normal vechi oxalatat: sursă de proconvertină şi factor Stuart.

– Tromboplastină.

– Clorură de calciu M/40.

Serul normal oxalatat se prepară în felul următor: se recoltează sînge normal pe tromboplastină în proporţie de 0,3 ml soluţie de tromboplastină pentru 10 ml sînge. Se amestecă rapid. Se lasă 5–6 ore la 37°. După coagulare şi retracţia cheagului se centrifughează, se separă serul şi acesta se amestecă cu oxalat de sodiu în proporţie de o parte oxalat de sodiu pentru 9 părţi ser. Se conservă în frigider la +4°, timp de 8 zile, după care poate fi folosit ca reactiv. Rolul tromboplastinei este de a provoca consumarea în întregime a protrombinei reziduale.

Controlul reactivului:

1. Trebuie să fie lipsit de activitate tromboplastică:

Ser normal oxalatat	0,1
Plasmă normală	0,1
Cl_2Ca	0,1

Nu trebuie să dea o scurtare a timpului de recalcifiere a plasmei.

2. Trebuie să fie lipsit de activitate trombinică:

Ser normal oxalatat	0,1
Fibrinogen standard	0,1

Nu trebuie să apară coagulare.

3. Trebuie să fie lipsit de protrombină: testul de consum de protrombină trebuie să arate absenţa protrombinei.

Tehnica

Se amestecă:

– Plasmă de cercetat diluată 1/10	0,1 ml
– Plasmă adsorbită	0,1 ml
– Ser vechi	0,05 ml
– Tromboplastină calcică	0,25 ml

Totul se lucrează la 37° în baie de apă. Din momentul adăugării tromboplastinei calcice se porneşte cronometrul. Se face o primă citire la 10 secunde, a doua la 20 şi apoi se fac citirile din 5 în 5 secunde.

Timpi normali: 25–35 de secunde. Determinarea se repetă de 2–3 ori, comparativ cu o plasmă martor normal.

b) Determinarea proaccelerinei

Reactivi:

– Plasmă oxalatată normală veche: sursă de fibrinogen, protrombină, proconvertină şi factor Stuart, dar lipsită de proaccelerină.

– Tromboplastină.

– Clorură de calciu M/40.

Prepararea plasmei vechi lipsită de proaccelerină: se recoltează sînge pe oxalat de sodiu, se separă plasma; această plasmă se conservă 48 de ore la termostat de 37°, apoi 10–15 zile la +4°.

Pentru control se determină un timp de protrombină Quick cu această plasmă; pentru a fi folosit ca reactiv, trebuie să dea un timp de minimum 2–3 minute.

Practic, acest reactiv se poate folosi, atunci cînd prin conservare dă un timp Quick de cel puţin 2–3 minute, indiferent de vechimea de conservare. Se poate conserva pînă la 30 de zile la +4°, cu condiţia să nu precipite tot fibrinogenul sau să se autolizeze.

Tehnica. Se amestecă:

Plasmă de cercetat diluată 1/10	0,1 ml
Plasmă veche	0,1 ml
Tromboplastină calcică	0,2 ml

Totul se lucrează la 37° în baie de apă. Din momentul adăugării tromboplastinei calcice se porneşte cronometrul. Se face prima citire la 10 secunde, apoi din 5 în 5 secunde.

Timpi normali: 20–25 de secunde. Determinarea se repetă de 2–3 ori, comparativ cu o plasmă martor normală.

Factorul V fiind labil, determinarea trebuie să se facă în prima oră după recoltare.

c) *Determinarea proconvertinei*

Reactivi:

— Plasmă normală filtrată prin filtru Seitz 20%: sursă de fibrinogen, proaccelerină și protrombină.

— Tromboplastină.

— Clorură de calciu M/40.

Tehnica. Se amestecă:

— Plasmă de cercetat diluată 1/10	0,1 ml
— Plasmă filtrată prin filtru Seitz 20%	0,1 ml
— Tromboplastină calcică	0,2 ml

Se lucrează la 37° în baie de apă. Din momentul adăugării tromboplastinei calcice se pornește cronometrul. Se face o primă citire la 10 secunde, apoi la 20 de secunde, apoi din 5 în 5 secunde.

Timpi normali: 25—35 de secunde. Determinarea se repetă de 2—3 ori, comparativ cu o plasmă martor normală.

Această tehnică determină în realitate timpul complexului VII proconvertină-factor Stuart (vezi mai departe).

d) *Determinarea protrombinei-proconvertinei*

Această tehnică determină în realitate timpul de protrombină-proconvertină și factor Stuart.

Reactivi:

— Plasmă normală adsorbită pe sulfat de bariu: sursă de fibrinogen și proaccelerină.

— Tromboplastină.

— Clorură de calciu M/40.

Tehnica. Se amestecă:

— Plasmă de cercetat diluată $^1/_{10}$	0,1 ml
— Plasmă adsorbită pe sulfat de bariu	0,1 ml
— Tromboplastină calcică	0,2 ml

Se lucrează la 37° în baie de apă. Din momentul adăugării tromboplastinei calcice se pornește cronometrul. Se fac citirile din 10 în 10 secunde pînă la 30 de secunde, apoi din 5 în 5 secunde.

Timpi normali: 20—30 de secunde.

Se fac 2—3 determinări comparativ cu plasmă normală.

Acest test se poate folosi mai ales în administrări de anticoagulante de tipul dicumarolului, protrombina, proconvertina și factorul Stuart fiind interesate împreună sub influența tratamentului.

e) *Determinarea complexului proconvertină-factor Stuart*

(Este tratată în capitolul următor).

f) *Trombotestul Owren*

Acest test, descris de Owren, servește pentru controlul bolnavilor supuși la tratament cu antivitamine K.

Este un amestec de cefalină, plasmă adsorbită, tromboplastină de bou și clorură de calciu în concentrație optimă.

Prin utilizarea cefalinei în reacție, alături de plasma adsorbită, trombotestul Owren, pune în evidență scăderile celor patru factori influențați de antivitaminele K; protrombina, proconvertina, factorul Stuart și factorul IX.

Produsul se livrează liofilizat. Se dizolvă într-o cantitate potrivită de apă cînd se lucrează cu sînge capilar sau dizolvarea se face cu clorură de calciu cînd se lucrează cu sînge citratat. Se amestecă 0,1 ml sînge cu 0,5 ml reactiv la 37°. Se urmărește coagularea amestecului, care, pentru un sînge normal, este de aproximativ 40 de secunde. După Owren, zona de hipocoagulabilitate terapeutică în administrarea de antivitamine K este cuprinsă între 25 și 10%, activitate „trombotest" care corespunde ca timp la 70 de secunde și 140 de secunde. Cînd se lucrează cu sînge citratat, atît recoltarea sîngelui, cît și eprubetele trebuie să fie siliconate. Folosirea sîngelui capilar prin înțeparea pulpei degetului nu necesită material siliconat.

STUDIUL FAZEI A TREIA A COAGULĂRII

1. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A FIBRINOGENULUI

A se vedea la „Biochimie".

2. CERCETAREA FIBRINOGENULUI B

S-a propus cercetarea fibrinogenului B ca test de diagnostic și prognostic în tromboze.

Fibrinogenul B este partea precipitabilă cu β-naftol în soluție alcoolică.

Tehnica. Metoda Cumming și Lyons.

Într-o eprubetă de hemoliză, conținînd 1 ml plasmă oxalatată, se adaugă 5 picături de soluție alcoolică de β-naftol.

Se folosește următoarea formulă:

β-naftol	0,002 g
Alcool etilic 50%	100 ml

Tubul se lasă la temperatura ordinară și se examinează după 15 minute. Cînd testul este pozitiv, se formează un gel mai mult sau mai puțin important. Un răspuns mai rapid se poate obține în 3—5 minute, punînd tubul la 5°. La indivizii normali, testul fibrinogenului B este constant negativ.

Este în mod deosebit pozitiv în trombozele arteriale și pare să fie legat mai mult de o necroză tisulară în evoluție decît de o tromboză evolutivă.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL UNUI SINDROM PROTEOLITIC

1. SINDROM PROTEOLITIC ACUT

(Diagnostic de extremă urgență)

Sindromul fiind dramatic și necesitînd o terapeutică de extremă urgență, diagnosticul de laborator în sindromul acut folosește tehnici rapide de orientare, totuși capabile de a pune un diagnostic sigur.

Deși probele de sînge sînt incoagulabile:

— Sîngele trebuie recoltat pe un anticoagulant, deoarece procesul de tromboplastinoformare și trombinoformare continuă să se desfășoare și consumă factorii respectivi.

— Se recoltează și sînge fără anticoagulant, pentru a urmări dacă coagularea apare sau nu.

a) Cercetarea fibrinogenului

Coagulare prin trombină. Se constată că:

Plasmă de cercetat	0,2 ml	Lipsă de coagulare
Trombină	0,2 ml	
Plasmă normală	0,2 ml	Coagulare în cîteva secunde
Trombină	0,2 ml	

Dacă după adaos de trombină plasma bolnavului nu se coagulează, există două posibilități:

— fie lipsă totală de fibrinogen;

— fie prezența unui anticoagulant de tip antitrombină.

Cercetarea unui anticoagulant circulant. Se fac următoarele amestecuri:

Plasmă de cercetat	0,1 ml	coagulare 1 minut și 30 de secunde = lipsă de anticoagulant
Plasmă normală	0,1 ml	
Clorură de Ca	0,2 ml	
Plasmă normală	0,2 ml	coagulare 1 minut și 30 de secunde
Clorură de Ca	0,2 ml	

Dacă amestecul de plasmă de cercetat și plasmă normală coagulează în limitele normale prin adaos de clorură de calciu, se exclude prezența unui anticoagulant. Deci lipsa de coagulare în proba cu adaos de trombină denotă o lipsă totală de fibrinogen.

Cercetarea fibrinogenului prin căldură. Se expune 1 ml plasmă de bolnav timp de 2—3 minute la 56°, concomitent cu o eprubetă de plasmă normală. Plasma normală se tulbură intens, datorită coagulării și precipitării fibrinogenului prin căldură. Plasma de bolnav, dacă este lipsită de fibrinogen, rămîne limpede, transparentă; dacă are urme de fibrinogen, prezintă fine precipitate.

b) Cercetarea proaccelerinei

Se amestecă:

Plasmă de cercetat diluată 1/10	0,1 ml
Plasmă normală veche de 15 zile	0,1 ml
Tromboplastină calcică	0,2 ml

Timpul de proaccelerină normal este în jur de 25 de secunde.

Timpul de proaccelerină este foarte prelungit: un minut sau cîteva minute, se observă în sindroamele cu proteoliză pronunțată.

c) Cercetarea timpului Quick

Datorită lipsei de fibrinogen, se va executa proba după adaos de fibrinogen reactiv:

Plasmă de cercetat	0,1 ml
Fibrinogen soluție $2{,}5^{0}/_{00}$	0,1 ml
Tromboplastină calcică	0,2 ml

În cazul sindromului proteolitic acut, coagularea este prelungită peste 50 de secunde. Prelungirea timpului Quick se datorește în primul rînd lipsei de proaccelerină, apoi lipsei de proconvertină și de protrombină.

d) Cercetarea paracoagulării

Cercetarea paracoagulării fibrinolitice (paracoagularea fibrinei). Pentru cercetarea paracoagulării, sîngele trebuie recoltat fără anticoagulant

Sînge de cercetat		0,5 ml
Tampon pH 7,6		0,3 ml
Sulfat de protamină	1%	0,2 ml

Cercetarea paracoagulării fibrinogenolitice (paracoagularea fibrinogenului)

Se amestecă :

Sînge de cercetat	0,5 ml
Tampon pH 7,6	0,2 ml
Trombină (20—100 u./ml)	0,1 ml

După o incubare de un minut se adaugă : Sulfat de protamină 1% 0,2 ml.

Adaosul de sulfat de protamină trebuie să se facă brusc. După Derekin, în caz de fibrinoliză trebuie să apară coagulare. Fenomenul paracoagulării este reproductibil numai în primele 4—5 minute de la liză.

2. SINDROM PROTEOLITIC SUBACUT

Dacă probele de sînge sînt coagulabile, se fac următoarele cercetări :

Cercetarea lizei spontane a cheagului sanguin. Se constată că :

— Sîngele se coagulează apoi apare liza totală a cheagului : liza apare în primele 60 de minute (sindrom acut) ; liza apare după 60 de minute (sindrom sub-acut).

— Sîngele se coagulează, apoi apare liza parţială a cheagului (cheag fărămiţat : sindrom latent).

Cercetarea lizei spontane a cheagului plasmatic. Se amestecă :

Plasmă de cercetat	0,5 ml
Trombină	0,1 ml

Se incubează la baie la 37°. Apare o liză în cîteva minute sau ore. Plasma normală nu se lizează nici după 24 de ore.

Cercetarea proaccelerinei şi *cerctarea timpului Quick* dau timpi prelungiţi, ceea ce denotă scăderea factorilor în cauză.

Fi-testul

Este un test rapid pe lamă (15—20 de secunde) pentru a detecta o hipofibrinogenemie sau o afibrinogenemie.

Principiul : este vorba de o reacţie de aglutinare a particulelor de latex pe care sînt fixaţi anticorpi antifibrinogen capabili să reacţioneze imunologic cu fibrinogenul conţinut în sîngele bolnavului. Reactivul latex-anticorpi antifibrinogen uman este standardizat în aşa fel încît reacţia de aglutinare nu apare decît dacă sîngele bolnavului conţine mai mult de 1 g‰ fibrinogen.

Cu truse speciale cu reactivi standardizaţi se foloseşte următoarea tehnică : o picătură de sînge capilar se diluează în cantitatea de soluţie tampon ce se găseşte în trusă într-o sticluţă specială. Pe o lamă se pune o picătură din sîngele astfel diluat, la care se daugă două picături din reactivul latex-anticorpi antifibrinogen uman. Picăturile se amestecă pe o suprafaţă circulară cu colţul unei lame.

O picătură de etalon normal, ce se găseşte în trusă, se amestecă cu două picături de reactiv latex-anticorpi şi reprezintă martorul normal pozitiv. Reacţia se citeşte în 15—20 de secunde.

Interpretare

— Dacă reacţia de aglutinare este intens pozitivă, cantitatea de fibrinogen în sîngele bolnavului este normală (2,5—4 g‰).

— Dacă reacţia este slab pozitivă (în comparaţie cu etalonul normal, cantitatea de fibrinogen în sîngele bolnavului este scăzută : 1—2 g‰).

— Dacă reacţia este negativă, cantitatea de fibrinogen este egală sau inferioară cifrei de 1 g‰.

Această reacţie nu dă nici o indicaţie despre existenţa unei fibrinolize, ci permite o apreciere aproximativă dar foarte preţioasă a cantităţii de fibrinogen sanguin.

3. METODE PENTRU STUDIUL FENOMENULUI LITIC

Aceste metode necesită timp şi nu pot fi aplicate în sindromul acut. Dacă aceste metode nu se pot pune în aplicare imediat, se recomandă păstrarea probelor de examinat la temperaturi joase de —20°, pentru a opri activitatea enzimatică.

Pentru a studia factorii care intervin în fenomenul proteolitic, trebuie să se aibă în vedere 3 categorii de fapte :

— modificările suferite de factorii sistemului litic ;

— natura substratului folosit în reacţie ;

— acţiunea reactivilor folosiţi.

1. Factorii suferă modificări în cursul lizei :

a) Plasminogenul se consumă, scade din plasmă şi poate să dispară complet.

b) Se poate pune în evidenţă o activitate litică reziduală în plasmă sau ser, care denotă prezenţa de plasmină liberă.

c) Activatorul nu se consumă în timpul lizei.

d) Antiplasmina se consumă pînă la dispariţie.

2. Folosirea fibrinogenului şi fibrinei ca substrat prezintă mai multe inconveniente : preparatele conţin mari cantităţi de plasminogen. De asemenea, reacţia poate fi influenţată de inhibitorii : antiplasmină.

Pentru îndepărtarea din substrat a plasminogenului şi a inhibitorilor, unele tehnici recomandă încălzirea substratului la 80°, timp de 45 de minute sau la 68°, timp de o oră.

Ca substrat se poate folosi cazeina în anumită concentraţie, aceasta fiind lipsită de factorii litici. Activitatea litică asupra cazeinei se măsoară prin titrarea aminoacizilor care rezultă din proteoliză.

3. Streptokinaza activează plasminogenul prin intermediul proactivatorului (acţiune indirectă). Activatorii tisulari sau urinari au acţiune directă asupra plasminogenului, transformîndu-l în plasmină. Trombina folosită ca reactiv coagulant poate să aducă cantităţi variabile de plasminogen.

a) *Determinarea timpului de liză a cheagului în diverse sisteme*

Amestecînd :

Plasmă normală	0,2 ml	nu trebuie să apară liză
Trombină soluţie	0,05 ml	

I.	Plasmă de cercetat	0,2 ml
	Trombină soluţie	0,05 ml

Liza poate surveni la proba I, într-un timp mai lung sau mai scurt, dacă în plasma de cercetat există o activitate fibrinolitică spontană (plasmină liberă).

Dacă bolnavul prezintă o afibrinogenemie (sînge incoagulabil). În acest caz se face proba a II-a : se apreciază viteza şi intensitatea lizei la 37°, comparativ cu o plasmă normală.

II.	Plasmă de cercetat	0,02 ml
	Fibrinogen soluţie 3 %	0,05 ml
	Trombină soluţie	0,05 ml

Liza în proba a II-a survine într-un timp variabil, dacă există activitate fibrinolitică spontană (plasmină).

III.	Plasmă de cercetat	0,2 ml
	Plasmă normală	0,05 ml
	Trombină soluţie	0,05 ml

Dacă apare liză în sistemul al III-lea, iar în sistemul precedent (II) nu se produce liză, înseamnă că plasma de cercetat nu conţine plasmină liberă dar conţine activator.

b) *Testul de rezistenţă la liză a cheagului*

Principiu : în prezenţa streptokinazei se activează sistemul litic. În caz de hipercoagulabilitate liza cheagului este mult întîrziată.

Reactivi : soluţie de clorură de calciu M/40 conţinînd 70 u. streptokinază/ml.

Tehnica : într-un tub de hemoliză se amestecă 1 ml de plasmă citratată de cercetat cu 1 ml de soluţie de Cl_2Ca cu streptokinază la baie de 37°.

Din momentul cînd plasma se coagulează se cronometrează timpul necesar ca liza cheagului să fie totală. Citirile se fac din 15 în 15 secunde.

Se procedează identinc cu o plasmă martor normală.

Rezultate : timpul normal este între 2 şi 4 minute.

În caz de hipercoagulabilitate şi de tromboze, timpul de liză este mult prelungit.

c) *Testul euglobulinelor*

Principiu : se izolează euglobulinele plasmei printr-un procedeu rapid, care are ca efect păstrarea activatorilor fibrinolizei şi eliminarea inhibitorilor care se aruncă cu supernatantul (pseudoglobuline).

Reactivi :

1. acid acetic glacial 1 %	1 ml ;
apă distilată	90 ml ;
2. Tampon borat :	
borat de Na	0,1 g ;
clorură de Na	0,9 g ;
apă distilată	ad 100 ml.
3. Clorură de calciu M/40	

Tehnică :

plasmă oxalatată	0,05 ml ;
reactiv nr. 1 (acid acetic)	0,9 ml.

Acest amestec se agită, apoi se lasă, timp de 30 minute, în frigider la +4°. Se centrifughează, se aruncă supernatantul. Precipitatul lipit de fundul eprubetei se redizolvă în 0,05 ml tampon borat. Apoi se adaugă 0,05 ml Cl_2Ca M/40 care produce coagularea soluţiei la temperatura băii de 37°. Se urmăreşte timpul de liză a cheagului :

1. Liză în mai puţin de 15 minute : fibrinoliză supraacută.
2. Liză în 15—30 de minute : fibrinoliză acută.
3. Liză în 30—60 de minute : fibrinoliză latentă.
4. Liză după 60 de minute : plasmă normală.

d) Cercetarea plasminogenului

Se face un amestec din :

IV.	Plasmă sau ser de cercetat	0,2 ml
	Streptokinază	0,1 ml
	Fibrinogen soluție	0,1 ml
	Trombină soluție	0,1 ml

Se face şi un martor cu plasmă sau ser normal.

Dacă plasma sau serul de cercetat determină liza într-un timp mai lung decît proba martor, conținutul lor în plasminogen este scăzut (deficit sau consum).

Dacă produsul de cercetat determină liza într-un timp mai scurt decît martorul, conținutul în plasminogen este mai mare.

e) Cercetarea antifibrinolizinei (antiplasminei)

Timpul 1 :
— 0,1 ml amestec în părți egale de plasminogen-streptokinază 130 u. /ml. ;
— 0,1 ml produsul de cercetat.
Se incubează timp de 3 minute la 37°.
Timpul 2 : Se adaugă :
— 0,1 ml trombină ;
— 0,1 ml fibrinogen 2,5%.

Se procedează identic, înlocuind produsul de cercetat cu ser normal şi cu ser fiziologic.

Cu cît timpul de liză este mai prelungit, cu atît puterea antifibrinolitică este mai mare. Dacă timpul de liză în proba cu serul de cercetat se apropie sau este identic cu cel din liza probei cu ser fiziologic, atunci în serul de bolnav s-a consumat toată antiplasmina.

Interpretarea acestor rezultate trebuie întotdeauna făcută comparativ cu martorul normal alăturat. Se pot urmări numai rezultate calitative, cele cantitative fiind greu de apreciat. Deşi reactivii folosiți conțin sub formă de impurități factorii de liză (fibrinogenul şi trombina conțin plasminogen, antiplasmină), totuşi folosind acelaşi reactiv şi la martor, se pot face aprecieri calitative.

f) Metoda Mac Farlane şi Biggs

Se bazează pe puterea de digerare a serului față de propriul său cheag de fibrină obținut prin recalcifierea plasmei sau adaos de trombină.

Se diluează plasma 1/16, 1/32, 1/64 în ser fiziologic tamponat cu tampon veronal-acetat. Se repartizează din fiecare diluție 1,6 ml în două serii de eprubete. Prima serie se coagulează cu o picătură de trombină şi a doua serie de eprubete cu 0,1 ml clorură de calciu M/20. Se incubează cele 6 eprubete la baie de apă la 37° şi se urmăreşte timp de 24 de ore, pentru a observa dacă a survenit liza cheagurilor şi cînd a survenit. Diluțiile mai mari sînt mai sensibile, deoarece factorii inhibitori sînt mai diluați decît cei ce produc liza.

Aprecierea fibrinolizei prin determinarea cantitativă a fibrinei (*Biggs şi Mac Farlane*). Se coagulează 3 probe de plasmă de examinat — diluate 1/25 în ser fiziologic tamponat — cu 0,1 ml soluție de trombină. În fiecare eprubetă se lasă o baghetă de sticlă pe care se fixează cheagul de fibrină. Probele se incubează la 37°, un timp variabil 1/2 oră, o oră şi $1^1/_2$ oră. Se transferă cheagurile fixate de baghete în alte 3 eprubete care conțin 10 ml de ser fiziologic, ținute la baie în apă cu gheață ; după 3 spălări cu ser fiziologic se procedează la determinarea cantitativă a fibrinei cu metoda colorimetrică ce utilizează reactivul Folin-Ciocîltău.

Rezultatele fibrinolizei se apreciază raportînd pe un grafic echivalentul tirozinic al cheagurilor în funcție de timpul de incubație.

g) Substratul inactivat prin căldură

(*Metoda în cutie Petri pe film de fibrină*)

Într-o cutie Petri de 5 cm diametru se pun 15 ml soluție de fibrinogen $5^0/_{00}$, la care se adaugă 0,1 ml soluție de trombină. După ce se coagulează, se încălzeşte la 68° timp de o oră.

Se pune soluția de testat pe suprafața stratului de fibrină şi se lasă la incubat la 37°. Se controlează la diferite intervale, în primele 24 de ore şi după aceasta, se determină diametrul zonei de liză. Se face un martor identic de substrat de fibrină preparat în condiții identice dar neîncălzit.

Sînt mai multe posibilități :

a) Dacă preparatul de testat produce liza, atît a substratului neîncălzit, cît şi a substratului încălzit, preparatul conține plasmină.

b) Dacă preparatul produce liza substratului neîncălzit şi nu produce liză cu substratul încălzit, preparatul conține activator.

c) Dacă preparatul de testat nu lizează nici unul din substrate, înseamnă că nu conține nici plasmină liberă, nici activator, dar poate să conțină plasminogen. În acest caz se mai face o altă probă prin adaos de streptokinază.

d) Preparatul de testat + streptokinază : dacă produce liză cu ambele substraturi, preparatul conține plasminogen.

h) *Folosirea cazeinei ca substrat*

Determinarea activității plasminei în serul integral (Schullman) este una din metode.

Materiale necesare:

1. Soluție de cazeină 6% în tampon fosfat M/10 (pH 7,4). Soluția se fierbe 10 minute.
2. Streptokinază.
3. Tampon fosfat cu pH 7,4.
4. Acid tricloracetic.
5. Proteoliza se măsoară prin determinarea aminoacizilor cu reactivul Folin (a se vedea partea de « Biochimie »).

Tehnică. Serul recoltat aseptic se poate păstra congelat maximum 3 luni.

Se incubează timp de 90 de minute, la 37° :

Ser diluat 1/2	1 ml
Cazeină 6%	1 ml
Streptokinază (2000 u.)	0,2 ml
Tampon	0,8 ml

Se oprește activitatea, adăugînd 3 ml acid tricloracetic 5%. După 30 de minute se filtrează prin hîrtie de filtru. Activitatea proteolitică se măsoară prin titrarea fotometrică a aminoacizilor rezultați.

Se mai face un martor fără streptokinază, pentru măsurarea activității proteolitice spontane a serului.

Rezultatele se pot exprima în unități proteolitice.

O unitate proteolitică a fost arbitrar stabilită ca fiind activitatea necesară ca să crească echivalentul de culoare la 50 μg tirozină în condițiile de digestie folosită.

Activitatea antitriptică. Se determină adăugînd 1 ml ser diluat la un sistem tripsină-cazeină avînd un volum total de 3 ml.

TROMBELASTOGRAFIA

Principiul metodei. Trombelastografia, imaginată și pusă la punct de Hartert, are ca scop înregistrarea fotografică a formării cheagului și calitățile sale fizice în funcție de timp.

Într-o cuvă cilindrică din oțel inoxidabil polizat se pune sîngele sau plasma recalcifiată. Această cuvă se mișcă printr-o rotație periodică de 4°45′ amplitudine, cu o perioadă de 9 secunde. Un cilindru tot din oțel inoxidabil polizat se cufundă în cuvă ; acest cilindru este suspendat pe un fir de torsiune, fir pe care este fixată o oglindă. Această oglindă reflectă o rază de lumină pe o bandă de hîrtie fotografică ce înaintează cu o viteză constantă de 2 mm/min.

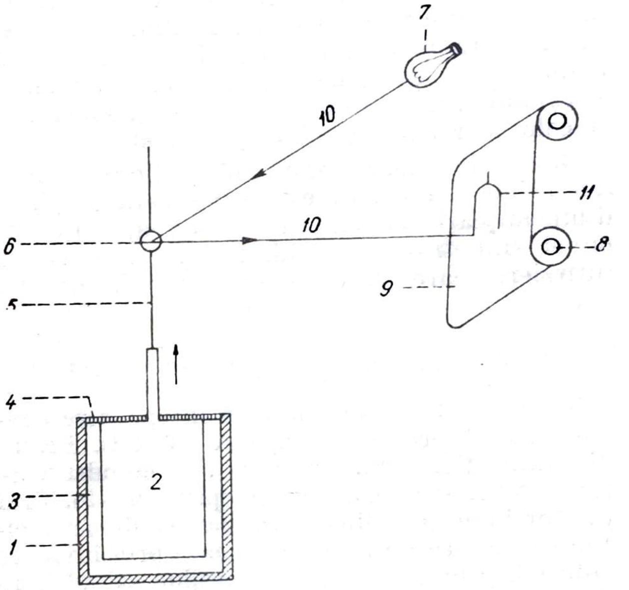


Fig. 197. — Schema principiului trombelastografiei ;
1 — cuvă ; *2* — piston ; *3* — sînge sau plasmă ; *4* — ulei de parafină ; *5* — fir de torsiune ; *6* — oglindă ; *7* — bec ; *8* — kimograf ; *9* — filtru ; *10* — rază de lumină. *11* — diagramă.

Atît timp cît sîngele (sau plasma) este în stare lichidă, cilindrul central nu poate fi antrenat de mișcările cuvei ; spotul luminos înscrie atunci, pe hîrtia fotografică, o linie dreaptă. Cînd sîngele coagulează, mișcarea cuvei se transmite cilindrului prin intermediul fibrelor de fibrină ; se înscrie atunci o curbă sub forma a două ramuri, care se îndepărtează mai mult sau mai puțin rapid, simetrice față de traseul inițial în linie dreaptă. Cele două ramuri se distanțează pînă la un moment dat. Cînd cheagul se retractă, această distanțare începe să se reducă ; aspectul general al curbei este acela al unui diapazon.

Interpretarea teoretică a diagramei. Cilindrul suspendat la firul de torsiune are un moment de inerție ridicat. El nu poate fi pus în mișcare decît atunci cînd filamentele de fibrină sînt fixate pe pereții cuvei și pe suprafața cilindrului : simpla interpunere a unui lichid cu vîscozitate ridicată nu este suficient pentru a antrena în mișcări cilindrul ; o primă proprietate a cheagului astfel pusă în evidență este *adezivitatea*.

Mișcările cuvei nu pot fi transmise cilindrului decît dacă fibrele de fibrină opun o oarecare rezistență mecanică la deformare sau alungire; o altă proprietate a cheagului, pusă în evidență de diagramă, este deci *rigiditatea* sa.

Amplitudinea mișcării cilindrului va depinde de *elasticitatea* întregii rețele de fibrină : astfel, forțele care rezultă din tracțiunea exercitată asupra filamentelor de fibrină — care, alungite, își revin la lungimea inițială — vin și se adaugă la cele ce rezultă din rotația cuvei.

Datorită acestor proprietăți, amplitudinea mișcărilor cilindrului este superioară amplitudinii mișcării cuvei. De asemenea, mișcările cuvei sînt transmise cilindrului cu o ușoară întîrziere care corespunde alungirii fibrelor elastice.

TROMBELASTOGRAFUL (HELLIGE 2601 D)

Trombelastograful poate să înregistreze concomitent 3 probe de sînge A, B și C. Privit din față (fig. 198), prezintă trei cilindri verticali A, B și C, care conțin pistonul (*2*), firul de torsiune și oglinda. În partea de sus, cilindrii au cîte un buton (16) care prin învîrtire coboară și urcă pistonul. La mijloc, cilindrii au de asemenea un buton (*18*) pus în legătură cu oglinda; acest buton servește la fixarea spoturilor luminoase în centrul scalei gradate (*15*) pe care se poate vedea, în timpul funcționării, amplitudinea mișcării celor 3 spoturi reflectate de oglindă. Sub pistoane se află cele trei cuve (*1*), care sînt așezate într-un termostat (*20*) menținut la 37°. La stînga cilindrilor se află un termometru (*17*) care indică temperatura constantă a aparatului, iar la dreapta un mic motor (*14*) care imprimă cuvelor mișcarea periodică (4° și 45′).

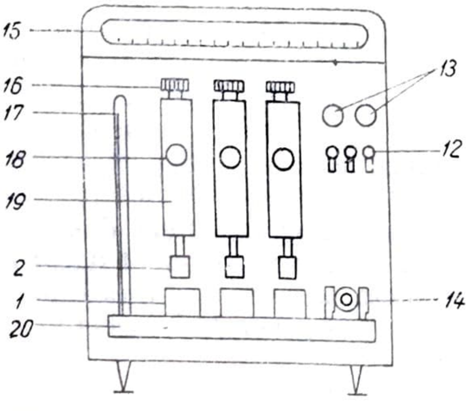


Fig. 198. — Schema trombelastografului (vedere din față).

Lateral în dreapta sînt două becuri de control (*13*), unul roșu care indică funcționarea aparatului, celălalt verde care indică funcționarea kimografului. Fiecare cuvă își are spotul propriu proiectat pe scală cu culoarea corespunzătoare (roșu, verde, galben); acestea pot fi proiectate pe scală, separat cu ajutorul clapelor (12).

Instalarea trombelastografului se face într-o încăpere ferită de trepidații, care pot da rezultate eronate, pe un postament solid, fix. Se evită orice mutare a aparatului, încăperile cu variații mari de temperatură sau cu curent de aer.

Se echilibrează aparatul pentru orizontalitate prin butonul de reglare (bulă de aer).

Nu este necesar să ținem cont de cantitatea de lumină din încăpere, deoarece caseta cu filme este perfect apărată de razele de lumină din cameră. Se recomandă însă ca instalarea aparatului de înregistrat (film) să nu se facă la lumina solară.

Ușa aparatului trebuie să fie deschisă (prin răsucirea butonului la stînga) atît timp cît aparatul este în stare de funcționare, pentru echilibrea temperaturii.

Pregătirea aparatului. Umplerea cuvelor mari de ulei se face la instalarea aparatului, folosindu-se ulei de parafină.

Curățirea cuvelor și pistoanelor. Acestea trebuie să fie perfect curate : impuritățile duc la rezultate eronate, ca și atingerea pistonului cu degetele.

După terminarea determinării se ia cuva și pistonul din aparat și se îndepărtează sîngele și parafina cu un jet subțire și puternic de apă rece. Resturile rămase se șterg cu vată și curățirea se face cu un amestec în părți egale de sulfat de bariu (pentru radiologie), apă și un detergent (ALBA), amestec ce formează o pastă. Tampoanele de vată se fac pe un suport special, care este atașat aparatului, nu cu pense metalice, deoarece trebuie evitată zgîrierea cuvei sau a pistonului, care sînt foarte ușor vulnerabile. Tamponul este înmuiat în amestecul de curățire și apoi se freacă ușor și cu precauție piesele. Se spală apoi cu jet de apă și se șterge cu tampoane de vată uscată. După curățire nu este permis să se atingă pistonul sau interiorul cuvei cu degetele.

Nu se va utiliza la curăţire alcoolul sau acetona. Pentru curăţire se fixează cuvele şi pistonul într-o clemă ce se livrează odată cu aparatul.

Incălzirea. Aparatul se pune la priză cu cel puţin 30 de minute înainte de începutul măsurării. Termostatul reglează temperatura cuvelor la 37°.

Instalarea cuvelor şi pistoanelor se face prin utilizarea clemei de fixare. Cuvele şi pistoanele poartă iniţialele ca DAA, DAB, DAC. Se recomandă să se utilizeze întotdeauna la un loc cuvele şi pistoanele cu aceleaşi iniţiale.

TEHNICA MĂSURĂTORILOR TROMBELASTOGRAFICE

Sîngele utilizat trebuie să fie sînge venos, nu capilar. Cercetarea se face fie pe sînge integral, fie pe plasmă citratată recalcifiată; rezultatele nu sînt identice, merg însă aproape paralel. Plasma oxalatată nu este utilizată din cauza lezării intense a trombocitelor. Se preferă utilizarea sîngelui integral.

Folosirea sîngelui integral. Pentru *recoltarea sîngelui* se preferă ace de oţel inoxidabil polizate în interior, cu diametrul interior de 1,2 mm.

Se lasă să se scurgă 1—2 ml sînge. Sîngele nu se recoltează cu seringa, ci direct în cuva aparatului.

Dacă bolnavul nu poate veni la laborator, sîngele se va recolta la patul bolnavului în cuva pusă în termostatul de transport care a fost în prealabil încălzit. Sîngele se duce imediat la aparat, unde trebuie să ajungă înainte de începutul coagulării, în primele 2—3 minute de la recoltare.

În momentul scurgerii primelor picături de sînge în cuvă se declanşează cronometrul. Cuvele se umplu pînă la 2/3 din volum (0,36 ml). Sîngele nu trebuie să conţină bule de aer sau spumă. Cuva se introduce imediat în aparat, apoi se introduce pistonul prin rotirea butonului respectiv, în sensul acelor de ceasornic, pînă ce este introdus complet în sînge. Surplusul de sînge se poate scoate uşor cu un ac de seringă inoxidabil şi uscat, astfel ca suprafaţa sîngelui să fie aproximativ cu 1 mm sub marginea superioară a cuvei. Umplerea insuficientă a cuvei dă rezultate incorecte. Se adaugă apoi cu o seringă şi un ac uşor îndoit ulei de parafină, pînă ce acoperă toată suprafaţa sîngelui din cuvă (1—2 picături de ulei).

La circa un minut de la declanşarea cronometrului (timp care se va standardiza) se porneşte agregatul de măsurat şi se începe înregistrarea. Se observă poziţia spoturilor luminoase pe scala din faţa aparatului: spoturile 1, 2, 3 se observă pe scală, devierile se corectează prin învîrtirea butonului negru.

Timpul scurs de la declanşarea cronometrului (la recoltarea sîngelui) pînă la pornirea înregistrării se numeşte timpul de umplere şi la calcul trebuie ţinut cont de el.

Măsurători făcute cu plasma citratată. Sîngele se recoltează ca mai sus şi se lasă să se scurgă peste o soluţie de citrat de sodiu 3,8%, care se găseşte într-o eprubetă siliconată; se pune o parte citrat pentru 4 părţi de sînge. Se astupă cu dop de cauciuc şi se omogenizează prin răsturnare, fără a agita.

Pentru obţinerea plasmei nu se centrifughează, ci se lasă să se sedimenteze spontan. Dacă V.S.H. este foarte scăzut, se va centrifiga 3—5 minute la 800—1 000 ture/minut. Măsurarea se va face în primele 2 ore de la recoltare. Cu o pipetă siliconată se pun 0,30 ml plasmă citratată în cuvă. Se lasă un minut, pentru ca plasma să ia temperatura aparatului şi se adaugă 0,06 ml de soluţie de clorură de calciu 1,29%, cu o seringă de tuberculină. Omogenizarea se face prin vîrtejul produs de adăugarea clorurii de calciu, fără să se introducă acul seringii în plasmă, fără să se facă bule de aer. În momentul introducerii clorurii de calciu se declanşează cronometrul. Ca timp de umplere se consideră timpul de la declanşarea cronometrului pînă la pornirea înregistrării.

Înregistrarea. Se învîrte butonul, în sensul săgeţii, cu 360° şi se scoate afară; prin aceasta intră în funcţiune dispozitivul care mişcă hîrtia fotografică. După introducerea pistonului şi acoperirea sîngelui cu ulei de parafină se deschide capacul de lumină. Din acest moment începe înregistrarea .Concomitent se observă liniile luminoase pe scală.

CONSTANTELE TROMBELASTOGRAFICE

Hartert defineşte diagrama prin 3 valori:

1. Timpul de reacţie sau timpul de latenţă r: începe cînd cuva se umple cu sînge integral sau cînd plasma citratată este recalcifiată şi se termină, cînd distanţarea celor două ramuri ale curbei atinge 1 mm.

2. Viteza de coagulare k: este distanţa care separă sfîrşitul timpului r pînă la punctul, fixat în mod arbitrar, ce corespunde la o distanțare de 20 mm a celor două ramuri ale curbei.

3. Elasticitatea maximală *Emx*: se obține prin măsurarea în milimetri a distanței *a* (amplitudinea maximală), care separă cele două ramuri ale curbei, cînd distanțarea lor este maximă.

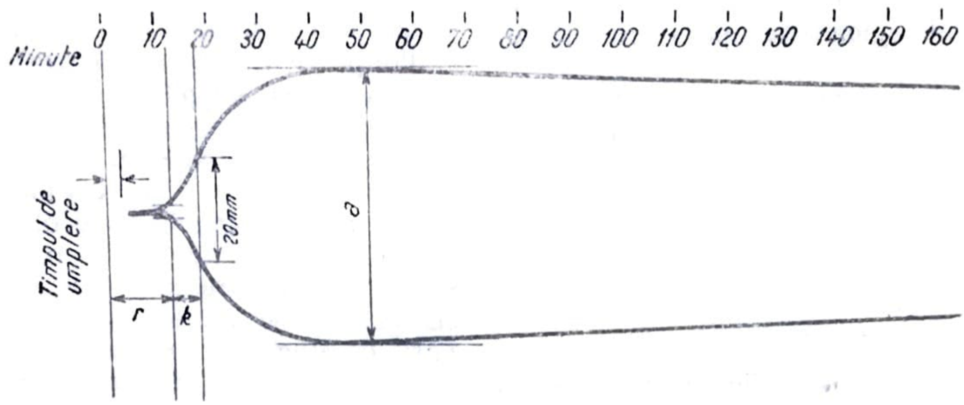


Fig. 199. — Diagramă trombelastografică normală și constantele.

Emx se calculează după formula :

$$Emx = \frac{100 . a}{100 - a}$$

Distanțele de pe diagramă se măsoară cu ajutorul unui compas; pentru valoarea *a* se consideră marginea externă a unui braț și marginea internă a celuilalt braț. Distanța în milimetri împărțită la 2 dă timpul în minute.

Semnificația constantelor este următoarea :

1. Timpul de reacție *r* corespunde fazei invizibile a coagulării, în cursul căreia se formează tromboplastina endogenă și trombina. Tromboplastinoformarea este mai lungă, spre deosebire de trombinoformarea care durează cîteva secunde. Rezultă că timpul *r* depinde mai ales, dar nu exclusiv, de formarea tromboplastinei endogene.

2. Constanta *k* reflectă transformarea fibrinogenului în fibrină sub influența trombinei; ea măsoară viteza de reacție trombină-fibrinogen și variază în funcție de cantitatea de trombină formată.

3. Amplitudinea maximală *a* și *Emx* reflectă rezistența la deformarea cheagului și mai ales rezistența la deformarea reversibilă (elasticitate); de această proprietate fizică și de adezivitate depinde o hemostază corectă. *Emx* variază în funcție de fibrinogen și de trombocite.

4. Constanta $r + k$: această cifră reprezintă durata totală a coagulării și corespunde, fie la timpul de coagulare a sîngelui total, fie la timpul de recalcifiere a plasmei.

Ea exprimă tromboplastinoformarea în ansamblu, adică viteza de formare și activitatea biologică a tromboplastinei endogene. Valori normale ale constantei $r + k$: cifră medie = 14 minute.

5. Constante de retracție : după limita transversală reprezentată de amplitudinea maximă a diagramei prin constanta *a*, diagrama înregistrează îngustarea ramurilor, adică retracția cheagului. Această zonă se caracterizează printr-o apropiere a celor două ramuri ale diagramei, care, în cele din urmă, devin paralele. Distanța a_{30} și a_{60} măsoară în milimetri amplitudinea ramurilor diagramei la 30 de minute și 60 de minute de la amplitudinea maximă *a*. Aceste constante comparate la valoarea *a* măsoară intensitatea retracției după un timp determinat.

Constante longitudinale : constantele *r* și *k* sînt denumite constante longitudinale și se exprimă în timp (în minute).

Constante transversale : constantele *a* și *Emx* sînt denumite constante transversale. Constanta *a* se exprimă în milimetri, iar *Emx* este un raport.

Valori normale ale constantelor.

Constante longitudinale :

$r = 9$ minute cu variații între 7 și 12 minute;

$k = 4$ minute cu variații între 3 și 6 minute.

Constante transversale :

$a = 50$ mm cu variații între 40 și 60 mm;

$Emx = 115$ cu variații între 80 și 150.

Rolul plachetelor în înscrierea diagramei trombelastografice.

Aspectul trombelastografic al unei plasme lipsită de plachete prezintă trei modificări ale curbei.

— Prelungirea segmentului *r* (tromboplastinoformare perturbată).

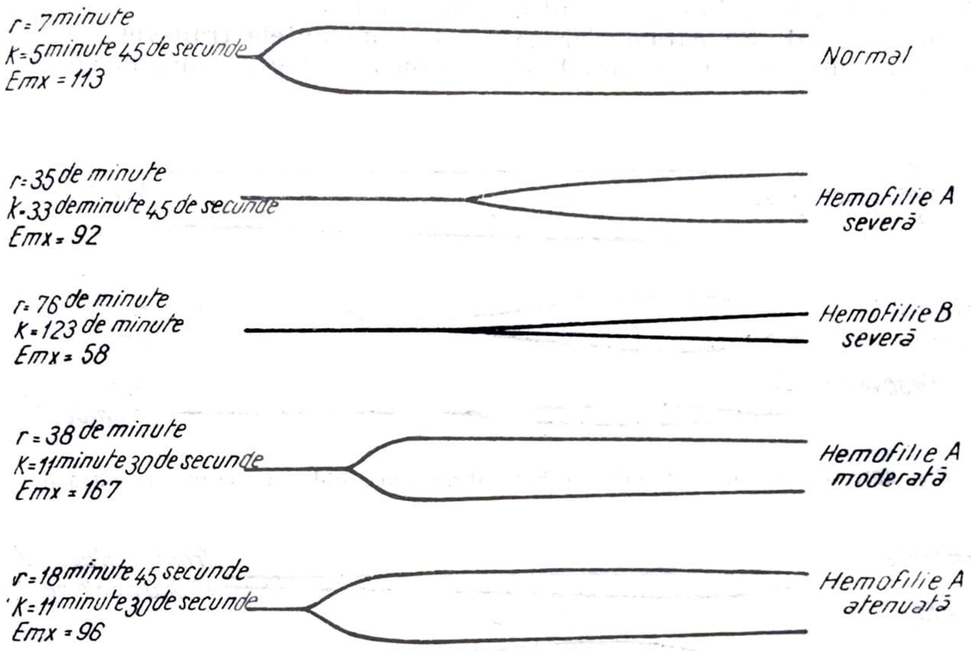


Fig. 200. — Trombelastograme în hemofilie.

— Reducerea amplitudinii maxime *a* (limitarea proprietăților dinamice ale cheagului).

— Un paralelism al ramurilor diagramei în porțiunea 3-a a traseului (absență de retracție a cheagului).

Dacă se adaugă la o plasmă deplachetizată plachete lizate (prin îngheț și dezgheț) care aduc factorul 3 trombocitar, se modifică numai segmentul *r* al diagramei, fără să se producă nici o modificare în amplitudinea maximă a ramurilor, nici asupra tendinței lor de a rămîne paralele. Numai adaosul de plachete proaspete redă un aspect normal al diagramei.

TROMBELASTOGRAMA ÎN STUDIUL SINDROAMELOR HEMORAGICE

1. SINDROAME HEMORAGICE PRIN DEFICIENȚĂ ÎN FACTORI PLASMATICI

În aceste sindroame se găsește :

r = mult prelungit.

k = prelungit în aceeași măsură.

Emx = **normal.**

Trobelastograma în hemofilie. Pentru determinarea tipului de hemofilie se fac corectări ale sîngelui integral sau ale plasmei în cuva aparatului și se urmărește modificarea diagramei în funcție de reactivul folosit. Reactivul de corecție se diluează 1/5 în plasma bolnavului.

De asemenea, prin amestecul de plasme se poate pune în evidență un anticoagulant circulant.

Trombelastograma în deficiențele factorilor complexului protrombinic.

În aceste cazuri :

r și *k* = prelungit; *Emx* = normal,

ceea ce traduce insuficiența și încetineala trombinoformării.

Tulburări legate de fibrinogen. La trombelastogramă se poate găsi :

— hiperfibrinogenemia : crește *Emx* și *a* ;

— hipofibrinogenemia : scade *Emx* și *a*, asociată și cu retracție precoce a cheagului. Diagrama se prezintă cu cele două ramuri foarte apropiate. În afibrinogenemie, diagrama se reduce la o linie dreaptă continuă.

Fibrinoliza prezintă un *r* și *k* deseori scurtați, o curbă cu amplitudine normală, apoi cele două ramuri se apropie și se contopesc formînd o linie dreaptă.

2. SINDROAME HEMORAGICE DE ORIGINE TROMBOCITARĂ

— În trombocitopenii, cheagul este mai puțin rigid decît în mod normal. Se caracterizează printr-o diminuare a amplitudinii maximale și prin lipsă de retracție a cheagului. Cînd numărul de trombocite scade sub 5 000/mm³, *r* este prelungit și constanta *k* nu poate fi calculată, distanța între cele două ramuri fiind sub 20 mm.

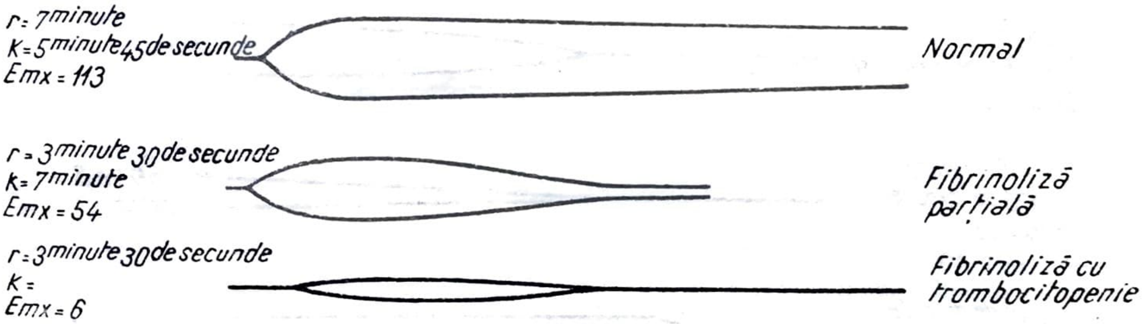


Fig. 201. — Trombelastogramă în caz de fibrinoliză rapidă în cursul înregistrării.

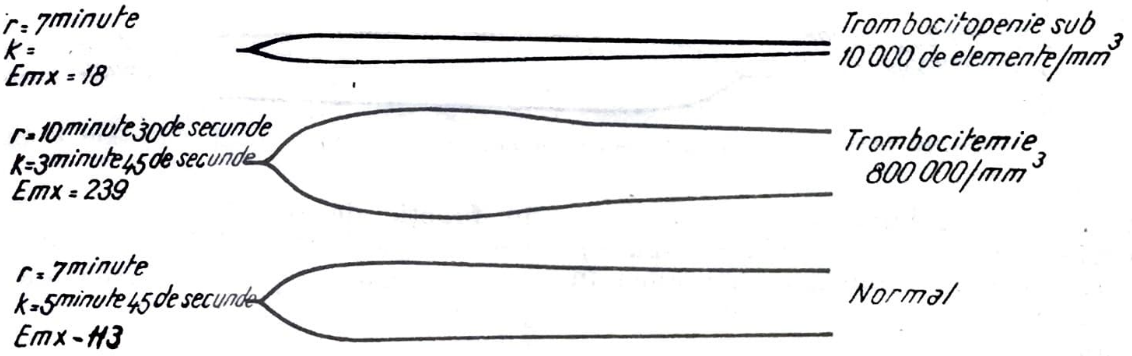


Fig. 202. — Trombelastogramă în trombocitopenie sub 10 000 de elemente/mm³ și în trombocitemie (800 000/mm³).

Constanta *Emx* depinde deci de numărul de trombocite, cînd cantitatea de fibrinogen este normală.

De asemenea, *Emx* este în funcție și de calitatea trombocitelor și scade în trombocitopatii.

— În trombocitemii se constată o creștere a raportului *Emx* și o hiperretractibilitate a cheagului.

3. SINDROAME HEMORAGICE PUR VASCULARE

În acestea, trombelastograma este normală.

INTERPRETAREA UNEI DIAGRAME TROMBELASTOGRAFICE

I. *Constanta r + k are o valoare normală (10 — 18 minute)*

1. Constantele transversale sînt normale. Concluzie: diagramă normală (fig. 203 I).

2. Constantele transversale sînt diminuate. *a* = scăzut

a) Dacă există o hiporetractilitate sau iretractilitate deficitul este la nivelul plachetelor, dar este un deficit parțial: acest aspect denotă o atingere a funcției trombodinamice a plachetelor, funcția lor tromboplastică fiind păstrată (trombopatie) (fig. 203 II).

b) Dacă există o retractilitate normală, este vorba de o hipofibrinogenemie izolată; *a* și *Emx* sînt cu atît mai scăzute, cu cît fibrinogenul este în cantitate mai mică. Diagrama se poate corecta prin adaos de fibrinogen (fig. 203 III).

c) O hiperretractilitate aparentă : o diminuare considerabilă a constantelor de retracție pînă la dispariție (întîlnirea celor două ramuri), cu constante longitudinale normal sau ușor prelungite, cu o constantă *a* diminuată pledează pentru o fibrinoliză.

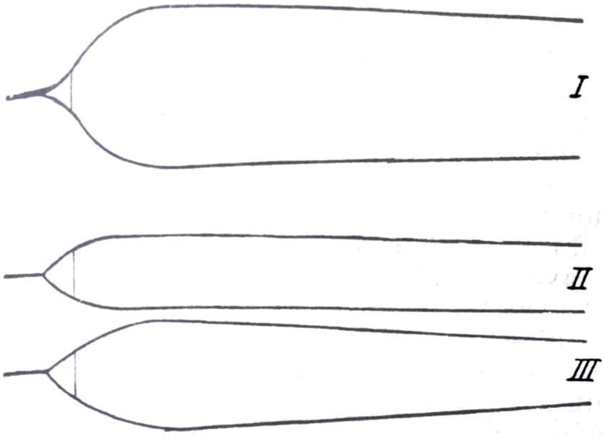


Fig. 203. — Trombelastograme : $r + k$ = normal.

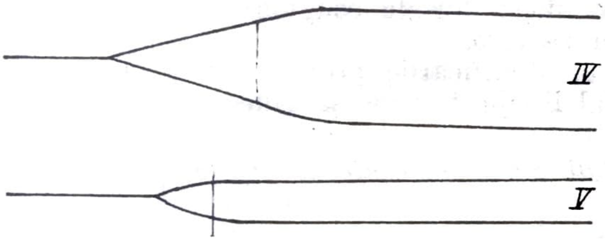


Fig. 204. — Trombelastograme : $r + k$ = prelungit.

3. Constantele transversale crescute : hipercoagulabilitate prin hiperfibrinogenemie izolată.

II. *Constanta* $r + k$ *este prelungită* (*peste 18 minute*)

Stare de hipocoagulabilitate

1. Cu constantele transversale normale :

a) Constanta r este mai prelungită decît k. Este vorba de deficiențe congenitale sau cîștigate ale factorilor complexului protrombinic.

- hipoaccelerinemie ;
- hipoprotrombinemie ;
- factor Stuart ;
- tratamente cu dicumarol.

Diagnosticul diferențial se poate face prin corectări specifice.

b) Prelungire considerabilă, atît a constantei r, cît și a constantei $k = \frac{r}{k}$ aproape 1.

Acest aspect se întîlnește în deficiența factorilor protromboplastici plasmatici sau în caz de anticoagulant circulant (fig. 200).

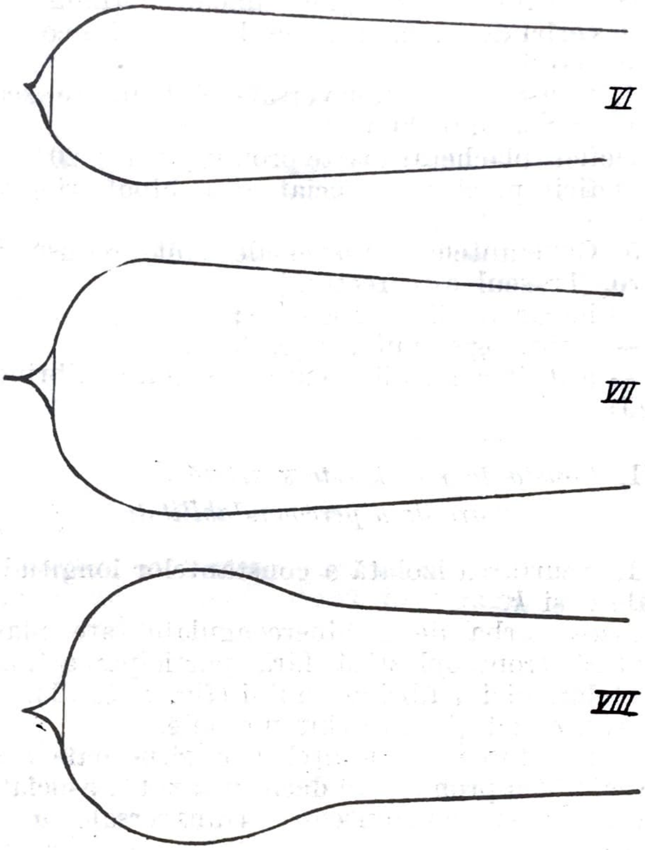


Fig. 205. — Trombelastograme : $r + k$ = scurtat.

Dacă adaosul de plasmă normală corectează traseul este vorba de hemofilie. Corectările făcute cu plasmă adsorbită și ser vechi precizează tipul de hemofilie.

Dacă plasma normală nu corectează este vorba de un anticoagulant circulant.

2. Constantele transversale sînt scăzute, dar *a* este superioară cifrei de 20 mm. Se constată o irectractilitate.

Este vorba de un deficit plachetar mixt, atît în ceea ce privește funcțiile dinamice, cît și cele tromboplastice așa cum se întîlnește în trombopenie (fig. 204 IV).

Hiporetractilitatea sau iretractilitatea absolută sînt puse în evidență prin valorile a_{30} și a_{60}, foarte apropiate sau egale cu *a*.

Anomaliile transversale și longitudinale constatate în plasma trombopenică sînt corectate printr-o suspensie de plachete proaspete, pe cînd plachetele lizate nu corectează decît constantele longitudinale.

3. Constantele transversale diminuate cu prezența unei hiperretractilități aparente.

Se întîlnește în sindroamele fibrinolitice: este vorba de o liză ce se produce după o coagulare anormală.

4. Constantele transversale sînt foarte scăzute, cu *a* sub 20 mm.

Deficit plachetar foarte pronunțat (fig. 204 V).

Deficit plachetar asociat cu o hipofibrinogenemie.

5. Constantele transversale sînt reduse la zero. Traseul este rectiliniu:

— heparinemii terapeutice;
— afibrinogenemii congenitale;
— afibrinogenemii acute cîștigate (fibrinoliză).

III. *Constanta $r + k$ este scurtată*
Stare de hipercoagulabilitate

1. Scurtarea izolată a constantelor longitudinale r și k.

Este vorba de o hipercoagulabilitate plasmatică tromboplastică fără participarea plachetelor, nici a fibrinogenului (fig. 205 VI).

Atît a, cît și *Emx* sînt normale.

2. Scurtarea constantelor longitudinale r și k mai puțin pronunțată decît în cazul 1, asociată cu creșterea constantelor transversale a și *Emx*.

Constanta *Emx* crește, atingînd cifra de 180, uneori 250 și chiar 300.

Se întîlnește în hipercoagulabilitatea trombocitară (fig. 205 VII).

În unele cazuri de hiperplachetoze, întîlnite în stări posthemoragice, în leucoze mieloide, în faza post-operatorie a splenectomiilor, se întîlnește o creștere a retracției, realizînd imagini de strangulare bruscă a diagramei denumite pseudofibrinoliză, cu diferențe importante între a, a_{30} și a_{60} (fig. 205 VIII).

3. Creșterea izolată a constantelor transversale cu r și k normale sau ușor scăzute.

Se întîlnește în stări de hiperfibrinogenemie izolate (unele colagenoze), caracterizate cu un a și *Emx* foarte crescute.

4. Hipercoagulabilitate mixtă, plasmatică și trombocitară asociază modificările descrise: scurtarea importantă a constantelor longitudinale și creștere însemnată a constantelor transversale.

VALOAREA PROBELOR DE COAGULARE ÎN PROFILAXIA, DIAGNOSTICUL ȘI TRATAMENTUL AFECȚIUNILOR TROMBOEMBOLICE

Factorii care caracterizează și favorizează apariția unei tromboze sînt:

1. Tulburările circulatoare care duc la stază.

2. Alterarea peretelui vascular: contactul trombocitelor cu peretele vascular alterat duce la aderarea și aglutinarea lor și la activarea unor factori plasmatici ca factorul Hageman, ce duc la declanșarea fenomenului de coagulare intravascular.

3. Variațiile hematocritului și vîscozității sanguine: în policitemii și în macroglobulinemii creșterea vîscozității sanguine duce la o viteză redusă a fluxului sanguin, mai ales în vasele de calibru mic și deci la stază și la alterarea peretelui vascular.

4. Tulburările umorale de hipercoagulabilitate se caracterizează prin creșterea concentrației factorilor de coagulare sau prin activarea lor *in vivo*.

5. Modificările proteinelor sanguine, în special lipoproteinele și glucoproteinele.

Tulburările umorale de hipercoagulabilitate sanguină

Acestea reprezintă o reacție a organismului care apare în împrejurări diferite. Cercetarea acestui fenomen este posibilă cu ajutorul probelor de coagulare care sînt modificate în sensul unui exces în factori ai coagulării grăbind desfășurarea acestui fenomen.

Starea de hipercoagulabilitate umorală se poate instala în următoarele împrejurări:

1. În cazul unui exces de factori ai coagulării: astfel o creștere a factorilor V, VII, a fibrinogenului etc. Un număr crescut de trombocite cu adezivitate și aglutinabilitate crescută. Trecerea de tromboplastină tisulară în circulație, în anumite împrejurări.

2. Prin diminuarea inhibitorilor ca heparina, antitrombinele neheparinice etc. sau prin diminuarea activității sistemului fibrinolitic.

Din punctul de vedere al modificărilor umorale, privind coagularea, se disting două tipuri de tromboze vasculare: unele care se însoțesc de hipercoagulabilitate și altele cu o stare de coagulabilitate normală (izocoagulabilitate). De asemenea, în cursul evoluției unei tromboze, reactivitatea organismului imprimă aspecte diferite.

Aspectul umoral major al unei tromboze arteriale se poate rezuma astfel :

Faza I : hipercoagulabilitate sanguină și creșterea lipoproteinelor β-lente și foarte lente.

Faza a II-a : hipocoagulabilitatea sanguină și reducerea lipoproteinelor β-lente în profitul lipoproteinelor β-rapide și foarte rapide, cresc glucoproteinele α_1 și mai ales α_2, ca semn de necroză tisulară.

Faza a III-a : întoarcerea progresivă la o coagulabilitate normală și la un echilibru proteinic fiziologic.

Din cele de mai sus rezultă că deși hipercoagulabilitatea este un simptom important al trombozelor nu este totuși un semn constant. Privind fenomenul în mod evolutiv, se poate constanta o stare de hipercoagulabilitate în prima fază a unei tromboze, urmată de o stare de hipocoagulabilitate reacțională (faza a II-a). Deci o tromboză în plină evoluție poate să coincidă la un moment dat cu o stare de hipocoagulabilitate. Aceasta nu exclude și nu contraindică administrarea de anticoagulante.

Pe de altă parte, o tromboză poate să se instaleze în prezența unei stări de coagulabilitate normală sau chiar unei hipocoagulabilități. De asemenea, o stare de hipercoagulabilitate nu coincide totdeauna cu tromboza.

Astfel privită problema, valoarea diagnostică și prognostică a hipercoagulabilității este limitată și trebuie încadrată și judecată paralel cu semnele clinice, cu celelalte teste de laborator și cu stadiul evolutiv al bolii.

S-a căutat să se stabilească semnele unui diagnostic cît mai precoce al trombozelor, decelarea chiar a unui stadiu premergător denumit stare de pretromboză. S-au pus multe speranțe în această direcție pe hipercoagulabilitate. După cele arătate mai sus, se poate deduce că este greu de prevăzut starea de pretromboză bazîndu-ne pe hipercoagulabilitate ; totuși decelarea unei hipercoagulabilități poate constitui un semn important premergător unei tromboze.

Punerea în evidență a unei hipercoagulabilități

Studiul coagulabilității globale prin toleranța la heparină

Printre testele coagulabilității globale, cel mai indicat și mai sensibil este *toleranța la heparină*. Cînd indicele de coagulabilitate este cuprins între 0,80 și 1,20 sîngele examinat este izocoagulabil ; cînd indicele este peste 1,20 arată o stare de hipercoagulabilitate.

Timpul de coagulare, timpul de recalcifiere și testul de coagulare-diluție sînt puțin sensibile și nu dau indicații sigure.

Aprecierea cantitativă a fibrinogenului : fibrinogenul este crescut în reumatism, în infarctul miocardic, în trombozele arteriale, în tromboflebite, în inflamații. În condiții patologice apar *in vivo* produși intermediari de polimerizare a fibrinogenului, fibrinogen B, profibrină, criofibrinogen care sînt produși instabili și se pot depune intravascular. Fibrinogenul B este fracțiunea de fibrinogen precipitabilă prin β-naftol. La indivizii normali, testul fibrinogenului B este constant negativ. Acest test este pozitiv în trombozele arteriale coronariene și altele, însă pare să fie legat mai ales de prezența unei necroze tisulare în evoluție decît de prezența unei tromboze în curs de formare. În trombozele venoase (flebitele membrelor inferioare), testul fibrinogenului B este negativ.

Studiul trombocitelor : numărul de trombocite, tendința de aglutinare pe lamă, retractibilitatea cheagului sînt crescute în infarctul de miocard, după splenectomii, după hemoragii, după intervenții chirurgicale.

Determinarea timpului de trombină

Scurtarea timpului de trombină este frecvent întîlnită în stările de hipercoagulabilitate. Aceasta se explică prin diminuarea antitrombinelor și în special a heparinemiei fiziologice, frecvent întîlnită în hipercoagulabilitate. Pentru a fi suficient de sensibil, testul trebuie executat cu o diluție de trombină care să dea cu o plasmă normală un timp foarte apropiat de 30 de secunde (a vedea tehnica timpului de trombină). De asemenea, fibrinogenul în proba de cercetat trebuie să fie în limite normale, deoarece o hiperfibrinogenemie, prin tendința de a lungi timpul de trombină, ascunde scăderea celorlalte antitrombine.

După intervenții chirurgicale, timpul de trombină este deseori scurtat, chiar după 24 de ore de la intervenție și această scurtare atinge un minimum între a 4-a și a 5-a zi și nu se normalizează decît după 10 zile.

O scurtare importantă postoperatorie sau *post partum* a timpului de trombină poate fi considerată ca un semn de alarmă pentru o tendință la flebotromboză.

Determinarea rezistenței cheagului la liză

Prin adaos de streptokinază la cheagul plasmatic se activează sistemul litic și cheagul se lizează. În stările de hipercoagulabilitate timpul de liză a cheagului este mult prelungit față de martorul normal.

Această prelungire denotă o diminuare a activității sistemului fibrinolitic, fie prin scăderea factorilor de liză (activatorul sau plasminogenul), fie prin creșterea activității antiplasminei.

Studiul trombelastografic

Trei tipuri de curbe se întîlnesc mai frecvent.

Tipul I : hipercoagulabilitate plasmatică fără participarea trombocitară : diminuarea constantelor longitudinale *r* și *k*.

Tipul al II-lea : hipercoagulabilitate trombocitară fără participare plasmatică : creștere a constantelor transversale și ușoară scădere a constantelor longitudinale în special interesînd constanta *k*.

Emx ajunge 180, 250 și 300.

Tipul al III-lea : hipercoagulabilitate mixtă asociind modificările obținute în tipul I și al II-lea.

Aplicarea acestor teste în urmărirea stărilor postoperatorii sau *post partum* poate fi de un real folos. Examene sistematice și repetate permit decelarea stărilor de hipercoagulabilitate care preced trombozele. Aceste stări sînt tranzitorii și necesită examene zilnice pentru a fi surprinse. Modificările apar între a 5-a și a 10-a zi după intervenție chirurgicală sau naștere și reprezintă un semn de alarmă ce impune aplicarea unui tratament cu anticoagulante.

SUPRAVEGHEREA UNUI TRATAMENT CU ANTICOAGULANTE DE TIPUL DICUMAROLULUI ȘI DERIVAȚII DE DICUMAROL ÎN AFECȚIUNILE TROMBOEMBOLICE

(Controlul de laborator)

Timpul de protrombină Quick

Se determină timpul de protrombină Quick al bolnavului înainte de tratament. După 48 de ore de tratament se face un control. Pentru produși ca dicumarol, acetat de etil (pelentan, tromexan), controlul trebuie repetat după 30—36 de ore. În prima săptămînă de tratament controlul se face la două zile.

Acest prim control după tratament permite fixarea dozelor zilnice de întreținere.

Bolnavul trebuie să primească o doză de întreținere zilnică în așa fel încît timpul lui de protrombină să arate 20 pînă la 30 procente de protrombină. Procente peste 30 sînt insuficiente din punct de vedere terapeutic, iar cele sub 20 prezintă pericolul accidentelor hemoragice. Procentul de 20—30 a fost denumit procent de hipocoagulabilitate terapeutică. După fixarea dozei, controlul de laborator se face o dată sau de două ori pe săptămînă.

Conducerea tratamentului cu anticoagulante fără a construi o curbă de diluție a plasmei normale :

Se administrează anticoagulantul și se fac controalele de determinare a timpului Quick, așa cum s-a arătat mai sus.

Se fixează o doză zilnică de anticoagulant, în așa fel încît timpul Quick al bolnavului să fie de două ori mai mare decît timpul martorului. Se știe că atunci cînd timpul bolnavului se dublează (a vedea curba diluțiilor) față de martor, procentul de protrombină este situat între 20 și 30.

Deoarece este greu de a menține timpul bolnavului la o cifră prea fixă, este permisă depășirea de 10 secunde față de dublul timpului martor.

Exemplu : dacă martorul are 12 secunde, bolnavul poate fi considerat în zonă terapeutică, cînd are 2 × 12 = 24 de secunde, cu depășiri permise pînă la 30—35 de secunde.

Toleranța la heparină

Toleranța la heparină *in vitro* este testul cel mai sensibil și mai sigur în supravegherea unui tratament prin anticoagulante de tipul dicumarolului.

Obiectivul tratamentului este obținerea și menținerea unei hipocoagulabilități, în așa fel încît timpul de toleranță la heparină al bolnavului să depășească aproape cu o treime timpul dat de plasma normală martor (la 1 unitate practică de heparină situată între 10 și 12 minute).

De exemplu : dacă martorul arată 12 minute, timpul bolnavului trebuie să arate 16 minute (cu o diferență de 1—2 minute în plus).

Un timp mai prelungit prezintă pericolul unei complicații hemoragice și necesită reducerea dozelor. Un timp egal sau mai scurt decît martorul necesită creșterea dozei.

Timpul de protrombină singură

Dozarea diferențială a protrombinei este recomandată ca un test util și sensibil în supravegherea terapiei cu antivitamine K. Ca margine terapeutică sigură se admite menținerea unei concentrații de protrombină între 10 și 25%.

Timpul de protrombină — proconvertină — factor Stuart

Această determinare se adresează celor trei factori care scad simultan sub influența terapiei cu antivitamine K. Acest timp este sensibil la mici variațiuni ale protrombinei, proconvertinei și factorului Stuart. Marginea terapeutică admisă este între 20 și 30%, procent ce se stabilește după o curbă de diluții a unei plasme normale, așa cum s-a arătat la procentele de protrombină Quick.

Trombotestul Owren

Prin utilizarea cefalinei în reacție, Owren pune în evidență prin acest test, scăderile celor patru factori influențați de antivitamine K, și anume: protrombina, proconvertina, factorul Stuart și factorul IX (Christmas).

Pentru un individ normal trombotestul Owren dă un timp de aproximativ 40 de secunde. După Owren zona terapeutică eficace este cuprinsă între 25 și 10% de activitate « trombotest » care corespunde ca timp la 70 de secunde și 140 de secunde.

Trombelastograma

Trombelastograma permite să se aprecieze tendința la hipercoagulabilitate. Cînd *Emx* depășește 150 și constantele longitudinale sînt scurtate, există o hipercoagulabilitate și este indicat tratamentul cu anticoagulante. Dozele administrate, pentru a fi eficace din punct de vedere terapeutic, trebuie să readucă valoarea *Emx* sub 150, aproximativ în jurul cifrei de 100 sau ușor sub 100, iar constanta a să fie cuprinsă între 40 și 50 mm. De asemenea, valorile scăzute ale constantelor longitudinale să fie prelungite pînă la limitele normale în așa fel ca suma $r + k$ să arate valori cuprinse între 10 și 18 minute. Atît timp cît *Emx* rămîne peste 150, dozele de anticoagulant nu trebuie diminuate.

VALOAREA COMPARATIVĂ A TESTELOR ȘI IMPORTANȚA ASOCIERII MAI MULTOR TESTE PENTRU CONTROL

S-a constatat că apariția unei hipoprotrombinemii nu este întotdeauna paralelă cu instalarea unei hipocoagulabilități. Scăderea proporției de protrombină, evaluată prin timpul Quick, la 20 sau 30%, nu este suficientă în toate cazurile pentru a neutraliza o hipercoagulabilitate și se poate întîlni, uneori, la unii bolnavi, un «procent de protrombină» inferior celui de 10% și, totuși, timpul de toleranță la heparină este normal sau mai scurt decît timpul martorului, ceea ce denotă că starea de hipercoagulabilitate persistă.

Invers, sînt cazuri cînd un « procent de protrombină », zis terapeutic, poate fi însoțit de o hipocoagulabilitate excesivă, decelabilă prin toleranța la heparină și susceptibilă de a provoca accidente hemoragice.

Scopul unui tratament anticoagulant prin dicumarol nu este deci obținerea unei « hipoprotrombinemii » standard, ci obținerea unei hipocoagulabilități globale, zisă de securitate, împotriva trombozelor. Eficacitatea terapeutică cu antivitamine K nu se exprimă numai prin alungirea timpului Quick, ci și prin modificările care survin în coagulabilitatea globală care se poate aprecia prin testul de toleranță la heparină.

Disocierea constatată între rezultatele obținute cu timpul Quick și toleranța la heparină provine din faptul că timpul Quick explorează numai faza a doua a coagulării fără să dea nici o indicație asupra substanțelor cu acțiune tromboplastică, pe cînd toleranța la heparină explorează coagulabilitatea globală.

Timpul Quick este un test care explorează coagularea extrinsecă. Orice modificare de hipercoagulabilitate, care interesează factorii tromboplastici plachetari sau plasmatici, nu este decelată de timpul Quick. În schimb acest test explorează scăderea proconvertinei care este factorul cel mai sensibil la acțiunea antivitaminelor K.

Testul de toleranță la heparină și trombelastogramă explorează coagularea intrinsecă, deci și faza I a coagulării cu factorii tromboplastici plachetari sau plasmatici, în schimb nu dau nici o indicație asupra modificărilor proconvertinei.

Disocieri asemănătoare se constată și între timpul Quick și rezultatele trombelastogramei, iar uneori între toleranța la heparină și trombelastogramă. Astfel timpul Quick poate să arate hipocoagulabilitate în zonă terapeutică, iar toleranța la heparină sau trombelastograma arată izocoagulabilitate sau hipercoagulabilitate. Sau toleranța la heparină arată izocoagulabilitate și trombelastograma hipercoagulabilitate. În astfel de cazuri trombelastograma supleează, în mod util, celelalte teste prin aducerea unui element nou în studiul coagulabilității sanguine, și anume noțiunea de elasticitate a cheagului care reflectă tendința la hipercoagulabilitate.

Din cele expuse rezultă că supravegherea unui tratament cu antivitamine K trebuie făcut prin mai multe teste de laborator: un test de coagulare extrinsecă, combinat cu un test de coagulare intrinsecă. Se asociază, obligatoriu, timpul Quick cu toleranța la heparină, la care se poate adăuga, cînd este posibil, controlul prin trombelastogramă.

Despre valoarea trombotestului Owren părerile sînt împărțite. Este nevoie de timp și experiență pentru o justă apreciere.

Intreruperea tratamentului

Întreruperea tratamentului nu trebuie să se facă niciodată brusc. Oprirea bruscă produce o hipercoagulabilitate reacțională care poate să agraveze boala. Dozele de anticoagulant trebuie să se reducă treptat și sub controlul testelor de laborator. Cînd prin reducerea progresivă a dozelor se constată o creștere a protrombinei peste 70%, o revenire a toleranței la heparină la normal sau elasticitatea maximă nu depășește limitele normale și nu are nici o tendință de creștere după oprirea medicației, numai atunci bolnavul poate fi eliberat de acest tratament.

Cercetarea hematuriei

Printre accidentele hemoragice în cursul administrării de dicumarol, hematuria este cea mai frecventă și mai precoce. Se recomandă examenul sistematic al urinii în cursul tratamentului.

Contraindicațiile administrării dicumarolului și a derivaților săi sînt următoarele:

— Nu se folosește imediat înainte sau după intervenții chirurgicale, mai ales după debridări mari sau drenaj. În astfel de cazuri, cînd este indicată obținerea unei hipocoagulabilități, se preferă heparina.

— În chirurgia căilor urinare și în neurochirurgie, dicumarolul trebuie administrat cu mare prudență.

— În sindroame hemoragice este contraindicat.

— În insuficiența hepatică, contraindicația este relativă: se utilizează doze mici.

— În cursul sarcinii.

— În avitaminoza E.

— Este necesară prudență și supraveghere strictă la persoane în vîrstă sau în caz de afecțiuni renale.

— Perioada menstruală nu reprezintă o contraindicație.

— Imposibilitatea supravegherii regulate prin teste de laborator este contraindicația absolută în administrarea dicumarolului și a derivaților acestuia.

SUPRAVEGHEREA TRATAMENTULUI BOLILOR TROMBOEMBOLICE DUPĂ ADMINISTRARE DE HEPARINĂ CA ANTICOAGULANT

Heparina are, în terapeutică, mai multe întrebuințări:

Se administrează ca anticoagulant, în afecțiunile tromboembolice; ca anticoagulant în circulația extracorporală; în al treilea rînd pentru acțiunea ei antiateromatoasă.

În administrarea heparinei cu scop antiateromatos, dozele ce se recomandă sînt rare (50 unități la două zile o dată) și nu necesită nici un control de laborator.

Administrarea heparinei cu scop anticoagulant în afecțiunile trombozante se poate face în doze discontinue sau în perfuzie continuă. Pentru supravegherea tratamentului după administrarea de heparină nu se folosește nici unul din testele enumerate mai sus. Singurul test folosit este timpul de coagulare.

Administrarea heparinei în doze discontinue pe cale intravenoasă nu expune niciodată la accidente, deoarece heparina se elimină în cîteva ore.

Riscurile de supradozare se observă cînd heparina se injectează în perfuzie continuă intravenoasă și cînd cantitatea perfuzată depășește eliminarea renală și distrugerea intravasculară. De asemenea, supradozarea se întîlnește în caz de tratament mixt cu heparină și antivitamine K, al căror efect se adună și jenează controlul de laborator prin prezența heparinei.

Supravegherea injecțiilor discontinue intravenoase de heparină.

O posologie corectă constituie cea mai bună garanție: se administrează 1 pînă la 1,5 mg/kilocorp /injecție, total 6 injecții în 24 de ore (1 mg heparină conține 100 unități).

Aceste doze reprezintă cifre medii care pot fi crescute în caz de embolie, de tromboze multiple și de hipercoagulabilitate exagerată sau diminuate cînd terenul (insuficiență hepatică sau renală, vîrsta înaintată) expune la hemoragii. După administrarea unei doze de heparină, revenirea la normal variază de la caz la caz. Următoarea doză de heparină trebuie făcută cînd bolnavul se găsește încă în ușoară hipocoagulabilitate sau în izocoagulabilitate. Întîrzierea administrării predispune bolnavul la o hipercoagulabilitate reacțională care trebuie evitată. Controlul se face cu ajutorul timpului de coagulare (Lee și White). Rezultatele depind însă de momentul efectuării testului în raport cu momentul injecției de heparină. Singurul control instructiv pentru a fixa intervalul între injecții este aplicarea toleranței la heparină *in vivo* (proba De Takats) în primele ore de la administrare: aceasta constă în determinarea timpului de coagulare la fiecare 30 de minute după injecția unei doze standard de 50 mg. Curba obținută dă indicații asupra efectului anticoagulant obținut și permite aprecierea dozei pe injecție și a celui mai bun interval între două injecții. Criteriul unei bune conduite terapeutice constă în a avea, la sfîrșitul fiecărui interval, o coagulabilitate *in izo* sau ușor *in hipo*.

Supravegherea perfuziei continue de heparină

Doza standard este de 5 mg/kilocorp/24 de ore.

Urmărirea se face cu ajutorul timpului de coagulare în eprubetă. Limitele bune admise sînt de 20—40 de minute la temperatura camerei sau 15—25 de minute la 37°. Sîngele se va obține din brațul opus celui care primește perfuzia. În funcție de timpii obținuți, dozele sînt crescute sau scăzute pentru a situa bolnavul în limitele timpului de coagulare admise.

Tratamentul accidentelor hemoragice prin anticoagulante.

În caz de anticoagulante de tipul dicumarolului:

— oprirea tratamentului;
— administrare de vitamină K_1;
— perfuzii cu plasmă.

În caz de pierdere de masă sanguină: transfuzii de sînge.

În caz de accidente prin heparină:

— oprirea tratamentului;
— utilizarea sulfatului de protamină: doză medie de 100 mg sau 10 ml dintr-o soluție de 1% injectată intravenos, foarte lent, în timp de 5—10 minute.

În caz de pierdere de masă sanguină se va face transfuzie de sînge.

ADMINISTRAREA DE HEPARINĂ ÎN CIRCULAȚIA EXTRACORPORALĂ

Indexul de protamină

Administarea de heparină în circulația extracorporală se întîlnește în aplicarea rinichiului artificial și în intervențiile ce necesită o circulație cord-plămîn artificial.

Rinichiul artificial

Bolnavii ce se supun dializei cu rinichiul artificial prezintă, deseori, înaintea acestui tratament, o tulburare a hemostazei, legată de insuficiența renală acută. Această tulburare survine în urma unei insuficiențe cantitative și calitative a trombocitelor, a unei fragilități capilare și a unui timp de sîngerare prelungit. După sau în cursul intervenției se poate adăuga o activitate proteolitică, cu sau fără fibrinoliză.

Doza de heparină este de: 1,5 mg/kilocorp.

Inimă-plămîn artificial

În timpul trecerii sîngelui prin aparat, intervin fenomene de suprafață și contact, care chiar în prezența suprafețelor siliconate, provoacă la receptor o scădere a numărului de trombocite și deseori o scădere a factorului A.

Cu toate aceste inconveniente, este mai periculos de a se administra o doză insuficientă de heparină sau de a corecta în totalitate heparinemia după intervenție. Riscul de coagulare intravasculară duce la un consum al factorilor de coagulare ce poate declanșa o fibrinoliză reacțională. Așa se explică faptul paradoxal că bolnavii mai puțin heparinați sînt cei mai expuși la hemoragii postoperatorii.

Aceste noţiuni explică de ce unii autori utilizează azi doze de 3 mg heparină/kilocorp, în loc de 1,5 mg/kilocorp.

De asemenea, sîngele se recoltează cu 20 mg heparină în loc de 15 mg pentru 400 ml sînge.

Indexul de protamină

Acest test determină doza utilă de sulfat de protamină ce trebuie injectată pentru a neutraliza toată heparina circulantă la bolnav, după intervenţie.

1. *Indexul de protamină efectuat pe timpul de coagulare.*

Acest test poate fi efectuat la patul bolnavului sau în sala de operaţie.

Principiu : se amestecă o cantitate de sînge de bolnav cu diferite concentraţii de sulfat de protamină şi se notează tubul în care coagularea se face în 15 minute.

Tehnica : dintr-o soluţie de sulfat de protamină 1% în ser fiziologic se prepară o serie de diluţii de la 1/200 la 1/20. O cantitate de 0,1 ml din aceste diluţii conţine între 5 şi 50 γ sulfat de protamină. În fiecare tub se adaugă 1,5 ml sînge şi după 15 minute se notează concentraţia de sulfat de protamină care dă o coagulare a sîngelui la temperatura camerei.

Diluţii de sulfat de protamină	1/200	1/100	1/66	1/33	1/20
0,1 ml soluţie sulfat protamină conţine ml	5	10	15	30	50
Sînge (ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Cunoscînd indexul de protamină, adică cantitatea de protamină necesară pentru a corecta timpul de coagulare, este uşor de a calcula cantitatea de sulfat de protamină ce trebuie injectată *in vivo*. Un index de 10 γ pentru 1,5 ml sînge, corespunde la 30 mg de protamină ce trebuie injectată *in vivo* pentru o masă sanguină medie de 4,5 l pentru un adult.

2. *Indexul de protamină efectuat prin timpul de trombină al plasmei.*

Se stabileşte o diluţie a trombinei, astfel încît să dea un timp de trombină de aproximativ 20 de secunde cu o plasmă normală. Se determină cantitatea de sulfat de protamină care readuce la normal timpul de trombină al plasmei de cercetat. Se fac următoarele diluţii de sulfat de protamină în γ/ml şi se lucrează cu 0,1 ml.

Diluţii de sulfat de protamină în γ/ml
0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4 ; 4,5 ; 5.

Se amestecă 0,1 ml din fiecare diluţie de sulfat de protamină cu 0,1 ml plasmă de testat şi 0,1 ml trombină. Se notează timpul de trombină al fiecărui amestec, la 37°.

Exemplu : 0,25 γ sulfat de protamină readuce la normal timpul de trombină a 0,1 ml plasmă de cercetat.

Dacă echivalentul heparină-protamină este de 1,5 γ sulfat de protamină, pentru a neutraliza 1 γ de heparină, în aceste condiţii plasma de cercetat conţine 1,66 γ heparină/ml. În caz cînd echivalentul este diferit, calculul se face în funcţie de echivalent.

Echivalentul heparină-protamină se determină *in vitro* cu cantităţi cunoscute din fiecare reactiv, cu ajutorul timpului de trombină al unei plasme normale.

Cunoscînd masa plasmatică a bolnavului se pot calcula cantitatea de heparină totală şi cea de sulfat de protamină necesară pentru a neutraliza toată heparina circulantă după intervenţia chirurgicală.

Este mai bine ca această neutralizare să nu se facă prea brusc şi să se prefere administrarea sulfatului de protamină în perfuzie lentă intravenoasă.

IV. SINDROAMELE HEMORAGICE

A. **SINDROAMELE HEMORAGICE PRIN DEFICIENŢA IN FACTORI PLASMATICI**

1. SINDROAMELE HEMORAGICE PRIN DEFICIENŢA LOCALIZATĂ ÎN PRIMA FAZĂ A COAGULĂRII

Aici se încadrează :
- Hemofilia A.
- Sindromul Alexander.
- Hemofilia B.
- Hemofilia C (sindromul Rosenthal).
- Deficienţa în factor Hageman.

Hemofiliile sînt boli hemoragice constituţionale, transmisibile ereditar. Sînt atinşi cu predilecţie indivizii de sex masculin, transmiterea făcîndu-se prin sexul feminin.

Deficienţa este plasmatică, interesînd factorii tromboplastici plasmatici care intervin în formarea tromboplastinei endogene (prima fază a coagulării).

Lipsa factorului A (VIII) caracterizează hemofilia A, cea mai des întîlnită : aproximativ 80% din cazurile de hemofilie.

Lipsa factorului B (IX) caracterizează hemofilia de tip B, întîlnită în aproximativ 20% din cazurile de hemofilie.

Lipsa factorului C (X) caracterizează hemofilia de tip C sau boala Rosenthal (factorul C fiind denumit şi factorul Rosenthal), afecţiune foarte rar întîlnită.

Hemofilia A

Hemofilia A este forma clasică cunoscută, cu caracter constituţional şi foarte des familial. Transmiterea ereditară este încă nelămurită şi deşi se întîlneşte în imensa majoritate a cazurilor la băieţi, există totuşi şi fete hemofilice. Statistica transmiterii ereditare a stabilit că, în general, femeia este transmiţătoare fără să aibă manifestări de boală.

Există următoarele posibilităţi:

1. Soţ normal + soţie transmiţătoare: este combinaţia cea mai frecventă; copiii rezultaţi pot fi: ¼ fete normale, ¼ fete transmiţătoare, ¼ băieţi normali şi ¼ băieţi hemofilici.

2. Soţ hemofilic + soţie normală: descendenţii băieţi sînt toţi normali, iar fetele toate transmiţătoare.

3. Soţ hemofilic + soţie transmiţătoare: descendenţii băieţi sînt ¼ normali şi ¼ hemofilici, fetele sînt ¼ transmiţătoare şi ¼ hemofilice.

4. Soţ hemofilic + soţie hemofilică. Această încrucişare este teoretică şi nu s-a putut observa pînă în prezent la om. A fost realizată experimental la cîine de Brinkhous.

Deşi geneticienii au făcut multe sforţări pentru a stabili legi în transmisibilitatea ereditară a hemofiliei, multe cazuri rămîn în practică nelămurite din punct de vedere ereditar.

Astfel, într-un număr important de cazuri, nu se poate stabili prin anamneză nici o tendinţă hemoragică la ascendenţi. Aceste cazuri se numesc hemofilii sporadice, datorite probabil unor transmisiuni de-a lungul multor generaţii.

Apariţia spontană neereditară a hemofiliei este posibilă. Dovadă în acest sens este faptul că frecvenţa hemofiliei nu a scăzut de-a lungul secolelor, cu toate că hemofilicii mureau foarte tineri, înainte de vîrsta de reproducere, cînd nu exista tratamentul cu sînge sau plasmă.

Aceste observaţii arată că patogenia este încă foarte obscură.

Din punct de vedere practic se poate constata că, în multe familii de hemofilici, băieţii sînt fie toţi hemofilici, fie toţi normali. În prezent nu există nici un mijloc de a recunoaşte femeile transmiţătoare şi, ceea ce se ştie, este faptul că toate fetele unui hemofilic sînt transmiţătoare.

Aspect clinic. Hemoragiile se pot constata din primele momente după naştere. În general apar după traumatisme neînsemnate, sub formă de echimoze şi hematoame. Un fapt important şi încă neexplicat este influenţa sezonieră: hemoragiile survin deseori primăvara şi toamna.

Cel mai frecvent se întîlnesc hematoamele şi hemoragiile intraarticulare sau hemartrozele. Se pot observa şi hemoragii externe sau hemoragii viscerale (hematurie).

Hemartrozele se observă mai ales la nivelul articulaţiilor mari. Repetarea lor duce cu timpul la limitarea mişcărilor, la deformare, la atrofie musculară şi impotenţă funcţională. Radiografic se constată leziuni osoase periarticulare şi intraarticulare.

Hemoragiile mucoasei bucale şi nazale sînt relativ frecvente şi grave. Hemoragiile dentare sînt foarte frecvente.

Studiul hemostazei în hemofilia A arată următoarele aspecte:

1. *Coagulabilitatea globală.* Testele coagulabilităţii globale arată o stare de hipocoagulabilitate foarte pronunţată.

Timpul de coagulare este foarte prelungit 20–60 de minute sau mai multe ore. Datorită acestei incoagulabilităţi, eritrocitele se sedimentează cu timpul, se separă plasma iar cînd survine coagularea, în jumătatea de jos a eprubetei se găseşte un cheag roşu de aspect normal, prelungit în sus cu o coagulare plasmatică (cheag alb, crusta flogistică a vechilor autori).

Celelalte teste ale coagulabilităţii globale arată o hipocoagulabilitate foarte accentuată.

Pentru ca să fie corect, timpul de coagulare trebuie făcut din sînge obţinut prin puncţie venoasă corectă şi rapid executată. Sîngele obţinut prin înţeparea pulpei degetului şi stoarcerea lui poate să dea un timp de coagulare foarte scurtat faţă de realitate, datorită amestecului sîngelui cu lichid tisular care, aducînd tromboplastină tisulară, corectează deficienţa şi scurtează timpul de coagulare.

Timpul de recalcifiere este prelungit: 5–10 minute sau mai mult.

2. *Hemostaza propriu-zisă legată de vas.* Timpul de sîngerare este normal. Celelalte teste ale hemostazei legată de vas, ca rezistenţa capilară, retracţia cheagului, caracterele trombocitelor sînt toate normale.

3. *Studiul primei faze a coagulării.* Deficienţa hemofiliei A este situată în această fază: lipseşte factorul A (VIII).

a) *Determinarea tipului de hemofilie* se face prin corectarea timpului de coagulare a sîngelui integral sau prin corectarea timpului de recalcifiere a plasmei bolnavului, folosind ca reactivi plasmă normală adsorbită cu sulfat de bariu şi ser normal vechi de 48—72 de ore.

Deficienţa de coagulare în hemofilia A este corectată de plasma normală adsorbită şi nu este corectată de serul vechi normal: acest rezultat se bazează pe caracterele factorului A care nu este adsorbit de sulfatul de bariu şi lipseşte din ser.

TABELUL 87

Determinarea tipului de hemofilie

Tipul de hemofilie	Plasmă normală adsorbită cu SO_4Ba	Ser normal de 72 de ore
Hemofilie A	Corectează	Nu corectează
Hemofilie B	Nu corectează	Corectează
Hemofilie C	Corectează	Corectează

Determinarea tipului de hemofilie se poate face şi prin corectarea timpului de consum de protrombină a sîngelui integral, cu ajutorul aceloraşi reactivi.

b) *Dozarea factorului antihemofilic* A arată o scădere pronunţată situată sub 5%.

c) *Testul de generare a tromboplastinei.* Acest test demonstrează că deficienţa priveşte factorul A: plasma de bolnav adsorbită cu sulfat de bariu dă o generare foarte deficitară.

d) *Studiul consumului de protrombină.* Consumul de protrombină este foarte deficitar; datorită lipsei factorului A, nu se formează tromboplastină endogenă activă şi rămîne o mare cantitate de protrombină reziduală în ser. De obicei, timpii de consum de protrombină sînt foarte scurtaţi, între 5 şi 10 secunde.

4. *Studiul fazei a doua şi a treia a coagulării* arată întotdeauna valori normale.

De menţionat este faptul că timpul de protrombină (Quick) este normal în hemofilie. În caz de sînge incoagulabil (timp de coagulare foarte prelungit), un timp Quick normal situează deficienţa în prima fază a coagulării, pe cînd un timp Quick prelungit denotă o deficienţă în a doua fază a coagulării, adică în complexul protrombinic. Timpul Quick este deci, o reacţie de orientare extrem de utilă de efectuat din primele momente, în vederea punerii unui diagnostic.

Cazurile de hemofilie cu simptomatologie şi teste de laborator atenuate. În aceste forme de hemofilie, o caracteristică importantă este timpul de coagulare normal sau la limita superioară: 12 sau 15 minute. Aceste forme au fost denumite hemofilie A′. Există însă forme de hemofilie A, care prezintă uneori remisiuni spontane, cu scurtarea timpului de coagulare.

Forma de hemofilie A′ este o formă atenuată. Diagnosticul se face pe baza testelor de laborator. Deşi timpul de coagulare este normal, bolnavul poate prezenta un sindrom hemoragic, hemostaza nefiind asigurată. Generarea tromboplastinei arată deficienţa în testul plasmatic (lipsă de factor A), consumul de protrombină este de asemenea deficitar, dozarea factorului A arată scăderea lui.

Diagnosticul acestor forme atenuate nu se poate face prin corectările sîngelui integral şi ale plasmei de bolnav, ci numai pe baza testului de generare a tromboplastinei, prin dozarea factorului A, prin consumul de protrombină şi corectarea consumului de protrombină. Aceste teste sînt fidele.

Pentru a nu se face greşeli de diagnostic, studiul unui hemofilic trebuie să se facă în perioada cînd nu primeşte transfuzii de sînge sau plasmă.

Sindromul Alexander

Este un sindrom foarte rar, care corespunde vechii denumiri de hemofilo-hemogenie.

Acest sindrom, lămurit în ultimul timp, după punerea la punct a testelor factorilor de coagulare, se caracterizează prin asocierea unei deficienţe plasmatice cu una vasculară: există o scădere a factorului A cu o prelungire a timpului de sîngerare.

Acest sindrom se poate găsi la ambele sexe, apare sporadic sau cu caracter familial.

Clinic prezintă manifestări hemoragice ca hematoame, hemartroze, peteşii, metroragii.

Studiul hemostazei arată:
— timpul de coagulare prelungit;
— timpul de sîngerare prelungit;
— fragilitate capilară;
— trombocite normale;
— consumul de protrombină deficitar;
— lipsa factorului antihemofilic A, decelată cu testele corespunzătoare.

Hemofilia B

Cercetările au arătat că plasma unor hemofilici poate corecta deficienţa de coagulare constatată la alţi hemofilici. Aceste rezultate au dus la concluzia că există mai multe tipuri de hemofilii, datorită lipsei unor factori diferiți, dar care acționează la aceeași fază a fenomenului de coagulare.

Transmiterea ereditară, cît și caracterele clinice în hemofilia B sînt identice ca în hemofilia A. Singura deosebire este că în hemofilia B se întîlnesc mult mai des forme fruste cu manifestări clinice mai atenuate. Această deosebire constă în faptul că, pentru a asigura o hemostază normală, este nevoie de o cantitate mai mică de factor B decît de factor A.

Studiul hemostazei în hemofilia B arată următoarele aspecte:

– Cercetarea și determinarea tipului de hemofilie B se bazează pe caracterele factorului B, care este adsorbit de sulfatul de bariu și este prezent în ser. Deficiența de coagulare în hemofilia B, este corectată de serul vechi normal și nu este corectată de plasma normală adsorbită.

– Testul de generare a tromboplastinei arată o deficiență a factorului seric.

– Dozarea factorului B arată lipsa acestui factor.

– Plasma de hemofilic A corectează deficiența hemofilicului B și invers.

– Celelalte teste: coagulabilitatea globală, testele hemostazei propriu-zise, legată de vas, consumul de protrombină, timpul de protrombină Quick, trombocitele, sînt identice ca în hemofilia A.

Hemofilia C

Factorul C, fiind denumit şi factorul Rosenthal, hemofilia C se numeşte şi *sindromul Rosenthal.*

Se transmite ereditar şi interesează ambele sexe în aceeaşi măsură.

Se întîlnesc de obicei forme fruste, cu timpul de coagulare normal şi consumul de protrombină uşor modificat.

Sindromul hemoragic se constată cu ocazia unor traumatisme sau intervenţii chirurgicale. Totuşi s-au observat şi forme severe care seamănă cu hemofilia clasică.

Studiul hemostazei arată:

– Determinarea tipului de hemofilie C se bazează pe caracterele factorului C, care este prezent în ser şi nu este adsorbit de sulfatul de bariu. Deficienţa de coagulare în hemofilia C este corectată atît de plasma normală adsorbită, cît şi de serul normal. Deficienţa în hemofilia C este corectată atît de plasma de hemofilic A, cît şi de aceea de hemofilic B.

— Testul de generare a tromboplastinei este hotărîtor: pentru a pune în evidenţă deficienţa în factor C cu ajutorul acestui test trebuie asociat în aceeaşi probă atît serul, cît şi plasma de bolnav, altfel deficienţa nu poate fi decelată.

Diagnosticul pozitiv în hemofilie

Diagnosticul pozitiv în hemofilie se bazează pe o hipocoagulabilitate marcată, cu timpul de coagulare prelungit şi timpul de recalcifiere de asemenea prelungit.

Testele hemostazei legate de vas sînt normale.

Timpul de protrombină Quick, ca şi dozările diferenţiale ale factorilor complexului protrombinic sînt normale, ceea ce situează deficienţa în prima fază a coagulării.

Caracteristic este un consum de protrombină foarte deficitar, cu timpi extrem de scurtaţi, mergînd de la 10—15 secunde la cîteva secunde. Spre deosebire de hemofilie, deficienţa consumului de protrombină în trombopenii este mai puţin accentuată şi cazurile de trombopenii cu deficienţă mai mare, care intră în zona consumului de protrombină a hemofiliei, se întîlnesc mai rar.

Testul de generare a tromboplastinei arată deficienţă în hemofilia de tip A, ca şi în cea de tip B. În hemofilia de tip C trebuie asociat testul plasmatic şi testul seric în aceeaşi probă, pentru a scoate în evidenţă deficienţa.

Determinarea tipului de hemofilie se face fie prin testul de generare a tromboplastinei, fie prin corectările coagulării sau consumului de protrombină arătate mai sus.

Diagnosticul diferenţial în hemofilie

1. Factorii vasculari, se pot elimina prin testele respective ale hemostazei, care sînt normale în hemofilie: timpul de sîngerare, rezistenţa capilară.

2. Cu deficienţele fazei a doua a coagulării: timpul de protrombină Quick, ca şi testele diferenţiale ale factorilor complexului protrombinic normal exclud deficienţa fazei a doua a coagulării.

3. Cu deficienţele fazei a treia a coagulării: prezenţa fibrinogenului exclude deficienţele fazei a III-a.

4. Prezenţa unui anticoagulant circulant: în hemofilie, plasma integrală normală, amestecată în diferite proporții cu plasma de bolnav, corectează timpul de recalcifiere a plasmei de bolnav ceeace exclude prezența unui anticoagulant.

5. Cu un sindrom proteolitic : în hemofilie, dozarea fibrinogenului arată valori normale; lipsa de liză a cheagului, proaccelerina normală coagularea imediată după adaos de trombină exclude proteoliza.

6. Cu deficiențe ținînd de trombocite, diagnosticul diferențial se face pe baza următoarelor caracteristici :

— Trombocitopenia: număr scăzut de trombocite, aglutinabilitate spontană scăzută a trombocitelor, retracția cheagului redusă sau abolită, rezistență capilară scăzută, timpul de sîngerare prelungit, timpul de coagulare normal. Testul trombocitar de generare a tromboplastinei este deficitar.

—Trombocitopatie : număr normal de trombocite, dar aspectul și studiul funcțional al trombocitelor, ca și testele hemostazei legate de vas sînt concludente. Testul trombocitar de generare a tromboplastinei este deficitar.

— Plasma lipsită de trombocite corectează deficiența în orice tip de hemofilie și nu corectează deficiența din trombopenie sau trombastenie.

Deficiența în factor Hageman

Acest sindrom, descris în 1955 de Ratnoff și Colopy, se caracterizează printr-o prelungire însemnată a timpului de coagulare, fără manifestări clinice hemoragice chiar în timpul intervențiilor chirurgicale.

Studiul hemostazei arată următoarele :

1. Coagulabilitatea globală : timpul de coagulare, timpul de recalcifiere, toleranța la heparină arată net o hipocoagulabilitate.
2. Consumul de protrombină : deficitar.
3. Tromboplastino-formarea (Biggs și Douglas) : testul trombocitar normal testul de generare seric normal, la fel și testul de generare plasmatic efectuat separat. Dacă în testul de generare se asociază, atît plasma, cît și serul bolnavului, atunci generarea de tromboplastină este practic redusă la zero.
4. Complexul protrombinic : normal.
5. Testele vasculare și trombocitele : normale.
6. Nu există anticoagulant circulant.

Se poate, deci, ușor constata că din punctul de vedere al probelor de laborator deficiența în factor Hageman este identică cu aceea din sindromul Rosenthal (hemofilie C). Deosebirea se poate face prin caracterele clinice : lipsă de sindrom hemoragic, chiar după intervenție chirurgicală în deficiența în factor Hageman, unde hipocoagulabilitatea se constată numai *in vitro*. De asemenea, plasma de bolnav cu sindrom Rosenthal corectează tulburarea de coagulare în deficiența Hageman și invers.

Faptul că absența factorului Hageman nu dă nici o manifestare clinică, tulburarea fiind constatată numai *in vitro*, a obligat pe unii cercetători să admită existența unui alt factor ipotetic care joacă *in vivo* același rol ca și factorul Hageman. Studiul factorului Hageman este încă în curs.

2. SINDROAMELE HEMORAGICE PRIN DEFICIENȚA LOCALIZATĂ ÎN A DOUA FAZĂ A COAGULĂRII

Sindroamele hemoragice prin deficiența localizată în a doua fază a coagulării interesează factorii complexului protrombinic :

- protrombina ;
- proconvertina ;
- factorul Stuart ;
- proaccelerina.

Caracteristica acestor deficiențe este prelungirea timpului de protrombină Quick.

Hipoprotrombinemia și hipoproconvertinemia

Datorită faptului că, sinteza protrombinei și proconvertinei se face, în prezența obligatorie a vitaminei K la nivelul celulei hepatice, acești doi factori suferă modificări paralele și simultane, în imensa majoritate a cazurilor, sub influența acelorași factori patogenici. Scăderea simultană a acestor doi factori se deosebește numai printr-o nuanță cantitativă, unul fiind mult mai atins decît celălalt, în funcție de factorul patogen determinant, deficiența fiind însă mixtă.

Hipoprotrombinemia și hipoproconvertinemia se pot observa în următoarele împrejurări patogenice :

1. *Aport insuficient de vitamină K* :
   - la nou-născut : sindrom hemoragic al nou-născutului ;
   - tulburări de absorbție intestinală ;
   - icter mecanic ;
   - tratament cu antibiotice.
2. *Insuficiență hepatică.*
3. *Antivitamine K* :
   - dicumarol și derivați ;
   - salicilați.
4. *Lipsă congenitală a protrombinei și proconvertinei* fără legătură cu vitamina K.

1. *Aportul insuficient de vitamină K* se poate produce prin mai multe mecanisme.

Sindromul hemoragic al nou-născutului. La nou-născut există o scădere fiziologică a protrombinei şi proconvertinei, datorită unei carenţe de vitamină K de la naştere, carenţă ce se accentuează în primele zile după naştere, datorită dietei din primele 24 de ore şi absenţei florei microbiene în intestinul nou-născutului.

La naştere, sîngele din cordonul ombilical arată un procent de protrombină de 70 (timp Quick). Între a doua şi a şasea zi, acest procent scade la 40 sau chiar 20, refăcîndu-se treptat pînă în a 10-a zi cînd revine la cifra de 70—80. Aproximativ unul din 200 de nou-născuţi poate prezenta un sindrom hemoragic în prima săptămînă după naştere dar, o dată vindecat, un astfel de sindrom nu mai reapare.

Hemoragiile digestive, ca hematemeze şi melene, sînt cele mai frecvente. Se pot asocia şi cu alte hemoragii : subcutanate, ombilicale urinare, genitale, cefalhematoame, hemoragii cerebro-meningiene. Aceste localizări sînt uneori în legătură cu traumatisme locale din timpul travaliului.

Studiul hemostazei arată un timp de protrombină (Quick) prelungit. Dozările diferenţiale arată o scădere a protrombinei şi proconvertinei.

Tratamentul cu vitamină K_1 este eficace.

Tulburări de absorbţie intestinală. În boala celiacă, sprue, colită ulceroasă, rezecţii intestinale întinse, datorită tranzitului intestinal exagerat, absorbţia vitaminei K este scăzută.

Icter mecanic şi fistule biliare. Pentru a se produce absorbţia vitaminei K în intestin, este necesară prezenţa sărurilor biliare. În primul rînd scade protrombina şi apoi şi proconvertina.

Tratamentul cu antibiotice şi bacteriostatice. Prin sterilizarea florei microbiene intestinale scade sinteza de vitamină K_2 la nivelul intestinului. Apare deci o carenţă, mai ales dacă şi aportul alimentar este scăzut.

2. *Insuficienţa hepatică.* Cînd celula hepatică este insuficientă, factorii coagulării nu pot fi sintetizaţi în condiţii normale, cu tot aportul de vitamină K. Cel mai sensibil factor în cazul insuficienţei celulei hepatice este proconvertina care scade prima. În insuficienţe mai înaintate scade şi protrombina. Proaccelerina scade ultima şi numai în insuficienţe grave.

3. *Antivitamine K.* Dicumarolul şi derivaţii lui se folosesc în terapeutică pentru efectul anticoagulant numai *in vivo*. Ei acţionează prin substituirea vitaminei K din procesul de sinteză a protrombinei şi proconvertinei, blocînd astfel sinteza acestor factori la nivelul celulei hepatice. Scăderea factorilor survine după 36—48 de ore, în funcţie de preparatul folosit, după ce protrombina şi proconvertina circulantă se consumă metabolizîndu-se. Dicumarolul nu influenţează aceşti factori decît indirect, oprind sinteza lor.

Salicilaţii au un efect asemănător dar de intensitate incomparabil mai slabă decît dicumarolul.

Proaccelerina nu este influenţată de antivitaminele K.

Cel mai sensibil la dicumarol este proconvertina care scade mai intens decît protrombina. De asemenea, sub influenţa antivitaminelor K, scade şi factorul Stuart şi factorul IX.

În caz de accidente hemoragice este necesară administrarea de vitamină K_1 *per os* sau parenteral, 50—100 mg. Uneori se asociază cu transfuzia de sînge (a se vedea ,,Controlul administrării anticoagulanţilor în clinică'').

4. *Lipsa congenitală a protrombinei sau proconvertinei.* Lipsa congenitală a protrombinei singure este o afecţiune excepţional întîlnită, în literatură fiind citate 2 sau 3 cazuri.

Lipsa congenitală a proconvertinei este rară ; se citează pînă în prezent aproximativ 12—15 cazuri în literatură, printre care şi o familie romînească (V. Kondi, A. Iacobescu, Şt. Bălan şi N. Mitrică). Trebuie să se facă deosebirea între scăderea congenitală a factorului Stuart şi cea de proconvertină. Majoritatea publicaţiilor de hipoproconvertinemie congenitală, apărute pînă la descoperirea factorului Stuart, sînt greşit studiate şi luate drept hipoproconvertinemii ; aceste afecţiuni reluate şi studiate s-au arătat a fi datorite în majoritate unei lipse de factor Stuart.

Studiul hemostazei. Timpul de coagulare este prelungit numai atunci cînd timpul de protrombină Quick arată o scădere pînă la 20% sau 30%, exprimată în procent de protrombină.

Dozările diferenţiale arată o scădere atît a protrombinei, cît şi a proconvertinei.

Prima fază a coagulări, generarea tromboplastinei, nu este influenţată nici de scăderea protrombinei, nici de scăderea proconvertinei.

Studiul hemostazei legată de vas şi al trombocitelor arată valori normale.

Se vor efectua testele de disproteinemie și explorarea funcțională a ficatului pentru a stabili o eventuală atingere hepatică.

Ancheta familială și găsirea aceleiași deficiențe la descendenți sau ascendenți întărește diagnosticul de lipsă congenitală a factorului.

Proba de saturație Koller. O semnificație importantă, ca probă funcțională hepatică, o are determinarea timpului de protrombină după administrare de vitamina K. Aceasta permite diferențierea hipoprotrombinemiilor prin deficiența funcției protrombinoformatoare a ficatului, de hipoprotrombinemiile prin deficiență de aport de vitamină K. Metoda constă în determinarea timpului de protrombină Quick înainte și la 24 de ore după administrarea intramusculară a 30 mg vitamină K_1. Lipsa de modificare a unui timp de protrombină Quick prelungit, după administrare de vitamină K, indică o incapacitate a ficatului de a efectua normal sinteza protrombinei, pe cînd revenirea unui timp alungit spre normal, prin administrare de vitamină K, traduce o hipoprotrombinemie extrahepatică și deci o funcție protrombinoformatoare hepatică integră.

Această probă este îndeosebi utilizată pentru diferențierea unui icter mecanic, în care hipoprotrombinemia se datorește absenței sărurilor biliare necesare absorbției vitaminei K în intestin, de icterul prin hepatită, în care hipoprotrombinemia este consecința insuficienței funcționale a ficatului.

Proba de saturație Koller este unul din testele cele mai utile pentru decelarea unei alterări hepatice serioase, cu condiția însă ca să existe o hipoprotrombinemie. În multe afecțiuni hepatice, însă, valoarea protrombinemiei rămîne normală și face testul Koller impracticabil.

În ultimul timp s-a stabilit că atît lipsa de vitamină K cît și insuficiența celulei hepatice are repercusiuni, în primul rînd asupra proconvertinei și apoi asupra protrombinei. Determinarea timpului impropriu-zis de protrombină Quick, care oglindește starea întregului complex protrombinic, este un test mai puțin sensibil. Determinarea diferențială a factorilor ca proconvertina sau protrombina permite decelarea unor deficiențe hepatice care, prin timpul de protrombină Quick, nu puteau fi puse în evidență. De asemenea, proba Koller determinată cu ajutorul dozării diferențiale a proconvertinei și protrombinei devine o probă mai sensibilă.

Proba hipoprotrombinemiei provocate. Cu această probă se pot obține date utile asupra stării funcționale hepatice.

Se administrează *per os* o doză unică de 300—450 mg de pelentan sau tromexan, asociată eventual cu dozarea anticoagulantului dicumarinic în plasmă. La indivizi normali, hipoprotrombinemia provocată, urmărită prin proba Quick, este puțin importantă (scade cu 20%), atinge cifra maximă la 24 de ore, iar timpul revine la normal în 48 de ore. În cazurile de hepatite, protrombinemia scade mai mult și nu revine la normal, datorită insuficienței de sinteză. Dozarea anticoagulantului arată la indivizii normali o concentrație maximă în sînge între 3 și 5 ore și dispare după 24 de ore, pe cînd în afecțiunile hepatice concentrația sa în sînge este mult mai ridicată și anticoagulantul rămîne în circulație peste 24 de ore, datorită eliminării sale defectuoase de către ficatul alterat.

Aceleași interpretări privind modificările proconvertinei și protrombinei în proba Koller sînt valabile și pentru proba hipoprotrombinemiei provocate, proconvertina fiind cea mai atinsă sub influența anticoagulanților de tip dicumarinic.

Studierea timpului de protrombină este indicată îndeosebi în cursul icterelor, unde el prezintă un *interes diagnostic și prognostic*: un timp normal pledează pentru o origine extrahepatică a icterului, iar unul mult alungit pentru o alterare hepatică importantă.

Interes prognostic: pentru un icter mecanic, un timp de protrombină normal sau ușor normalizabil după administrarea de vitamină K permite să se prevadă că intervenția chirurgicală va fi în general ferită de complicații hemoragice intra- sau postoperatorii; pentru un icter prin hepatită, timpul de protrombină constituie un test de urmărire a evoluției bolii spre vindecare sau spre agravare.

Diferențierea proconvertinei de factorul Stuart. Pînă la descoperirea factorului Stuart, deficiențele complexului VII (proconvertina — Stuart) erau toate considerate ca hipoproconvertinemii. Există astfel în literatură observații publicate sub numele de hipoproconvertinemie congenitală, care recontrolate s-au dovedit a fi deseori deficiențe congenitale în factor Stuart. Adevărata hipoproconvertinemie congenitală este o afecțiune rară, care trebuie și poate fi azi deosebită de o deficiență în factor Stuart.

Din ultimele date cunoscute în prezent asupra coagulării sîngelui se admite că formarea tromboplastinei endogene active care rezultă din interacțiunea factorilor al VIII-lea, al IX-lea și al X-lea, a factorului Hageman și a factorului al III-lea trombocitar, se produce în prezența ionilor de calciu, a factorului Stuart și a factorului al V-lea. Deci, proconvertina nu intervine în formarea tromboplastinei endogene active.

Pentru a deveni activă și a transforma protrombina în trombină, tromboplastina tisulară necesită prezența proconvertinei, a factorului Stuart, a factorului al V-lea și a ionilor de calciu.

În consecință, timpul de protrombină Quick apare prelungit, atît în hipoproconvertinemii, cît și în deficiențele factorului Stuart și nu poate da nici o indicație.

Deficiența în proconvertină nu afectează testul seric de generare a tromboplastinei care se prezintă normal. De asemenea consumul de protrombină este normal în aceste cazuri.

În deficiențele în factor Stuart, atît testul seric de generare a tromboplastinei, cît și consumul de protrombină sînt deficitare.

Criteriile diferențiale și directe între proconvertină și factorul Stuart sînt următoarele:

— Tripsina, ca și veninul de viperă Russel nu au nevoie de proconvertină pentru a transforma protrombina în trombină. Cu alte cuvinte, timpul de tripsină și timpul Stypven (cu venin de viperă Russel) sînt normali în deficiența în proconvertină și prelungiți în deficiența în factor Stuart.

— Dozările diferențiale ale factorilor complexului protrombinic arată procente normale pentru proaccelerină și protrombină și o deficiență foarte importantă a complexului VII (proconvertină — factor Stuart). Determinarea proconvertinei în mod diferențial este în realitate o tehnică care determină complexul VII, fiind incapabilă să facă o diferențiere între cei doi factori ai acestui complex.

Deficiența în factorul al V-lea

Spre deosebire de protrombină și proconvertină, al căror metabolism este legat de vitamina K și celula hepatică, proaccelerina nu este influențată de vitamina K, iar în insuficiența hepatică proaccelerina este ultimul factor care este atins.

Hipoproaccelerinemia se constată în următoarele tulburări:

— insuficiențele hepatice grave;
— sindroamele proteolitice;
— boala congenitală: parahemofilia Owren.

TABELUL 83

Diagnosticul biologic diferențial al deficiențelor în proconvertină și în factor Stuart

		Deficiența în proconvertină	Deficiența în factor Stuart
1	Timpul Quick cu tromboplastină	Prelungit	Prelungit
2	Timpul de tripsină (timpul Quick cu tripsină)	Normal	Prelungit
3	Timpul Stypven (venin de viperă Russel)	Normal	Prelungit
4	Testul de generare a tromboplastinei (test seric)	Normal	Prelungit
5	Consumul de protrombină	Normal	Deficitar
6	Timpul de proconvertină (complex VII)	Prelungit	Prelungit

Hipoproaccelerinemia din insuficiența hepatică. Așa cum s-a menționat mai sus, cel mai sensibil factor în insuficiențele celulei hepatice este proconvertina, apoi protrombina, și în cele din urmă, proaccelerina. Proaccelerina nu este influențată decît în insuficiențele grave înaintate ale celulei hepatice, care însoțesc sclerozele hepatice extensive și scleroza generalizată la întreg sistemul reticulo-histiocitar, proaccelerina fiind sintetizată în celulele acestui sistem.

Hipoproaccelerinemia în sindroamele proteolitice. Dintre factorii coagulării, inclusiv fibrinogenul, proaccelerina este factorul cel mai sensibil la acțiunea litică a plasminei. Spre deosebire de modificările factorilor complexului protrombinic în cursul insuficienței hepatice, în care proaccelerina este puțin sensibilă, în sindromul proteolitic proaccelerina este primul factor atins, urmînd după ea protrombina și proconvertina. Cercetarea proaccelerinei reprezintă astfel un test indirect foarte sensibil în cercetarea unei stări de proteoliză subacută sau cronică.

Hipoproaccelerinemie congenitală — parahemofilia Owren. Este o afecțiune foarte rară, descrisă de Owren în 1947; atinge ambele sexe.

Din punct de vedere *clinic* există forme grave cu sindrom hemoragic accentuat, forme moderate care se manifestă cu hemoragii provocate prin extracții dentare, intervenții chirurgicale și forme latente.

Studiul hemostazei arată:

— Prelungirea permanentă a timpului Quick.

— Scăderea izolată a proaccelerinei.

— Consumul de protrombină deficitar.

— Testul plasmatic de generare a tromboplastinei arată deficiență datorită lipsei factorului al V-lea.

Deficiența constatată în consumul de protrombină și în tromboplastinoformare denotă intervenția factorului al V-lea în formarea tromboplastinei endogene active, deficiență ce apare în orice hipoaccelerinemie.

Diagnosticul diferențial al deficiențelor fazei a doua a coagulării

1. Factorii vasculari și trombocitari: se pot elimina ușor prin testele respective ale hemostazei, care sînt normale în cazul deficiențelor factorilor care intervin în faza a doua a coagulării.

2. Prezența unui anticoagulant circulant: timpul de protrombină (Quick) prelungit pune problema unui anticoagulant de tip antitrombină, antitromboplastină sau cu acțiune inhibitoare asupra unui factor din complexul protrombinic; faptul însă că plasma integrală normală, amestecată în diferite proporții (de la 1/2 la 1/10) cu plasma de bolnav, corectează timpul de protrombină Quick al plasmei de bolnav dovedește că nu poate fi vorba de un astfel de anticoagulant.

3. Cu un sindrom proteolitic: sindromul proteolitic acut se poate elimina prin faptul că sîngele sau plasma acestor bolnavi coagulează, deși timpii pot fi prelungiți, ceea ce denotă că fibrinogenul este prezent. De asemenea, prin adaos de trombină, sîngele sau plasma bolnavului se coagulează. Cheagul nu prezintă liză. Cînd se constată o scădere a proaccelerinei, trebuie cercetați factorii de liză. În sindroamele proteolitice cronice, scăderea izolată a proaccelerinei este un semn indirect important de activitate litică. Dozarea factorilor litici este necesară pentru întărirea diagnosticului.

4. Cu deficiențele primei faze a coagulării: timpul de protrombină Quick prelungit exclude deficiențele factorilor care acționează în primul timp al coagulării.

5. Cu deficiențele fazei a III-a a coagulării: o deficiență în fibrinogen se elimină ușor.

3. SINDROAMELE HEMORAGICE PRIN DEFICIENȚA LOCALIZATĂ ÎN FAZA A III-A A COAGULĂRII

Scăderea fibrinogenului în sînge poate să producă tulburări mari în coagulare, dînd naștere la hemoragii grave; ea poate fi de diferite grade, de la hipofibrinogenemie pînă la afibrinogenemie.

Există afibrinogenemii congenitale și afibrinogenemii cîștigate (sindrom proteolitic).

Afibrinogenemia congenitală (boala Rabe-Solomon)

Este o afecțiune foarte rară, caracterizată prin lipsa totală a fibrinogenului în sînge, datorită unei perturbări în metabolismul acestei proteine. Au fost descrise pînă în prezent aproximativ 30 de cazuri.

Clinic este vorba de un sindrom hemoragic cu sînge complet incoagulabil, cu perioade de remisiuni și recăderi asemănătoare hemofiliei. Lipsa fibrinogenului în sîngele acestor bolnavi este totală, astfel încît sîngele lor nu coagulează după adaos de trombină. Afară de fibrinogen, ceilalți factori ai coagulării sînt normali, ca și factorii de liză, ceea ce exclude posibilitatea unei proteolize. Astfel de bolnavi se prezintă clinic ca hemofilici. Simptomele sînt mai ușoare decît în hemofilie. Hemoragiile survin numai cu ocazia unui traumatism sau unor ulcerații viscerale. Hemartroza, foarte frecventă în hemofilie, nu se observă în afibrinogenemia congenitală. Boala se poate observa la ambele sexe. Prognosticul acestei afecțiuni rare este grav. Majoritatea bolnavilor nu ating vîrsta adultă. Este posibil azi, sub influența tratamentului cu fibrinogen injectabil, ca acest prognostic să fie mult ameliorat.

Diagnosticul de laborator. Cercetarea fibrinogenului prin adăugare de trombină peste sîngele sau plasma bolnavului arată o lipsă totală de fibrinogen.

Cercetarea unui anticoagulant circulant rămîne negativă și cercetarea fenomenului de liză arată valori normale. Restul factorilor de coagulare sînt nemodificați.

În afibrinogenemia congenitală se poate pune în evidență, în sîngele bolnavului, recoltat fără anticoagulant, prezența de trombină liberă. Această reacție se poate face în felul următor: sîngele de bolnav se centrifughează, din supernatant se iau 0,2 ml care se amestecă cu 0,2 ml plasmă normală sau cu soluția de fibrinogen. După cîteva secunde apare o coagulare, ceea ce arată prezenţa trombinei şi denotă că, în sîngele de bolnav, fenomenul coagulării se desfăşoară în mod normal, datorită prezenţei tuturor factorilor de coagulare, realizînd convertirea protrombinei bolnavului în trombină. Lipsind însă fibrinogenul — substratul coagulării — cheagul nu apare.

Formarea tromboplastinei endogene este normală, la fel ca şi consumul de protrombină. Nu există un consum exagerat de fibrinogen. Fibrinogenul injectat în scop terapeutic dispare în 8 — 10 zile din sîngele bolnavului, la fel ca la un individ normal.

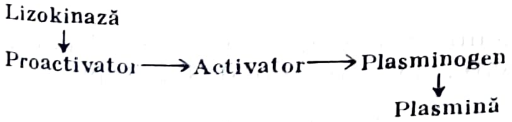
Sindromul proteolitic

Denumirea de sindrom fibrinolitic a fost înlocuită cu aceea de sindrom proteolitic, deoarece liza interesează nu numai fibrinogenul, ci şi alţi factori ai coagulării şi proteinele plasmatice.

Mecanismul transformării plasminogenului în plasmină a fost precizat în capitolul care tratează despre timpul al cincilea al hemostazei.

În cursul unor afecţiuni poate surveni activarea plasminogenului în plasmină, ferment activ cu acţiune proteolitică asupra fibrinogenului, fibrinei şi altor factori ai coagulării : proaccelerina, protrombina, proconvertina, factorii antihemofilici.

Plasminogenul poate fi activat în plasmină sub acţiunea lizokinazelor din ţesuturi cu acţiune indirectă prin intermediul unui sistem proactivator-activator, după următoarea schemă :



Lizokinazele se găsesc în ţesuturi şi în concentraţii mai mari, în special în plămîn şi în uterul gravid, ceea ce explică frecvenţa mai mare a sindromului hemoragic proteolitic în chirurgia pulmonară şi în obstetrică.

Plasminogenul, o dată activat în plasmină, prin depăşirea puterii inhibitoare a antiplasminei, se instalează proteoliza.

Pe lîngă liza factorilor coagulării, sindromul proteolitic se caracterizează şi prin modificările care survin la nivelul sistemului litic :

a) un consum al factorului litic : plasminogenul se consumă, scade ;

b) se poate constata o activitate litică reziduală : prezenţa de plasmină liberă în plasmă ;

c) proactivatorul se activează ;

d) antiplasmina se consumă.

Se admite că ţesuturile şi organele bogate în lizokinaze eliberează aceste substanţe sub influenţa unor factori patologici sau a intervenţiilor chirurgicale. O dată ajunse în circulaţie, la o concentraţie mai mare, se poate declanşa proteoliza.

O altă ipoteză susţine că proteoliza apare în urma eliberării de factori tromboplastici tisulari care duc într-o primă fază la o hipercoagulabilitate sanguină, urmată de sindromul de liză ca un fenomen de apărare exagerată împotriva hipercoagulabilităţii creată în prima fază.

Modificările factorilor de coagulare, care se constată *in vivo* în cursul proteolizei, sînt consecinţa acestei proteolize şi nu a unei sinteze deficiente sau unei insuficienţe hepatice. Rapiditatea revenirii la normal a acestor factori, după trecerea sindromului proteolitic, este în perfect acord cu acest punct de vedere.

Proteoliza poate fi acută, subacută şi latentă.

Sindromul proteolitic acut se caracterizează printr-o fibrinogenoliză totală : sîngele scos din organism nu coagulează.

Apare în cursul următoarelor afecţiuni :

— intervenţie chirurgicală toracică ;

— în obstetrică : intervenţii pe uter gravid, avorturi spontane sau provocate, făt mort macerat, infecţii cu *Cl. perfringens*, uneori după o naştere normală sau complicată de izoimunizare Rh ;

— în şoc : hemoragic, traumatic, prin arsură, în şocul hemolitic prin transfuzie de sînge incompatibil.

Studiul hemostazei (*diagnostic şi terapeutică de extremă urgenţă*). Apariţia unei hemoragii incoercibile cu sînge incoagulabil în cursul acestor afecţiuni îndreaptă imediat diagnosticul spre o fibrinogenoliză acută.

În lipsa totală a fibrinogenului (sîngele nu coagulează după adaos de trombină sau după încălzire) se asociază modificări însemnate privind ceilalţi factori ai coagulării.

Astfel, timpul de protrombină (Quick), executat cu adaos de fibrinogen, rămîne foarte prelungit.

Dozările diferenţiale arată un deficit constant în proaccelerină, protrombină şi proconvertină. Proaccelerina este scăzută cu peste 80 %. Dintre toţi factorii coagulării, proaccelerina este cea mai sensibilă la acțiunea litică, fibrinogenul fiind relativ rezistent la liză în comparație cu proaccelerina. Protrombina și proconvertina scad, dar întotdeauna mai puțin decît proaccelerina. Proconvertina pare mai rezistentă la proteoliză decît protrombina. Factorii antihemofilici sînt sensibili la liză; complementul suferă și el acțiunea proteolizei.

Cercetarea factorilor de liză arată:

— plasminogenul și antiplasmina se consumă în totalitate sau scad foarte mult;

— se poate pune în evidență o activitate litică reziduală: plasmină liberă;

— se poate pune în evidență prezența unui activator al plasminogenului.

Cercetarea unui anticoagulant circulant rămîne negativă.

Sindromul clinic este dramatic: sindrom hemoragic generalizat cu echimoze, hematoame, hemoragii uterine în cazurile obstetricale. În intervențiile chirurgicale pe torace, sindromul poate surveni intraoperator sau imediat după operație: hemotorace, pierdere de sînge prin dren sau prin sifonul de aspirație.

Prognostic: este foarte sever.

Tratamentul se face cu sînge și cu fibrinogen injectabil, în medie 4—6 g. Asocierea în terapeutică a inhibitorilor Kunitz sau Frey ca iniprol, zimofren (trasylol) a dat rezultate încurajatoare.

Sindromul proteolitic subacut se caracterizează printr-o fibrinogenoliză parțială: sîngele scos din organism se coagulează, apoi redevine fluid prin liza fibrinei, după un interval variabil de la coagulare.

În unele cazuri, procesul litic este mai puțin pronunțat. Fibrinogenul scade dar nu dispare. Sîngele scos din organism coagulează deseori mai rapid decît în mod normal. Cheagul format se dizolvă ulterior, după primele minute sau după primele ore de la coagulare.

Un astfel de sindrom se întîlnește în împrejurări chirurgicale și obstetricale identice cu cele din formele acute, dar se mai poate întîlni în: cancer de prostată, cancer de pancreas, ciroze hepatice, trombopenii acute, leucoze acute.

Sindromul hemoragic este mai puțin dramatic: se observă hematoame, echimoze întinse, hemoragii mucoase.

În proteoliza subacută se întîlnește constant o prelungire a timpului Quick. Dozările diferențiale arată că această prelungire se datorește, în primul rînd, unei deficiențe în proaccelerină; protrombina și proconvertina sînt relativ puțin modificate.

Important de notat este că, în proteoliza subacută, dozarea plasminogenului și antiplasminei arată cifre normale; acești factori par nemodificați, cel puțin după procedeele actuale de investigație.

Sindromul proteolitic latent sau frust se caracterizează printr-o fibrinoliză de foarte mică intensitate: sîngele, scos din organism, se coagulează și cheagul rămîne de aspect normal sau se prezintă fărîmițat, fără ca fibrinoliza să fie totală.

Dozarea fibrinogenului la astfel de bolnavi arată procente variabile: fie scăzute, fie normale, fie uneori peste normal.

Modificările cele mai însemnate le suferă însă factorii coagulării mai sensibili la liză decît fibrinogenul: timpul Quick la astfel de bolnavi poate fi crescut, iar dozarea proaccelerinei singure arată scăderea ei. De asemenea, factorul antihemofilic A este scăzut.

Proteoliza latentă se întîlnește în poliglobulii, în trombocitemii, în unele forme de leucemie mieloidă cronică, în unele pancitopenii idiopatice.

Atingerea moderată a factorilor de coagulare sub acțiunea proteolizei contribuie la apariția sindromului hemoragic care se poate observa în aceste afecțiuni.

B. SINDROAMELE HEMORAGICE DE ORIGINE TROMBOCITARĂ

Sindroamele hemoragice de origine trombocitară se clasifică în:

— trombocitopenii, cu număr scăzut de trombocite;

— trombocitopatii, cu număr normal de trombocite, dar funcțional deficitare.

TROMBOCITOPENII

Clasificarea etiologică a trombocitopeniilor este identică cu clasificarea etiologică a citopeniilor (a se vedea pancitopeniile).

I. Atingerea medulară prin factori exogeni:

a) Factori fizici.

b) Factori chimici.

c) Factori chimici medicamentoși.

d) Factori alimentari.

e) Factori infecțioși.

II. Obliterare medulară:

— Mieloscleroză, osteopetroză.

III. Metaplazii. Metastaze medulare.

IV. Inhibiție medulară de origine splenică:

— Hipersplenism : poate avea o acțiune dublă, centrală, de inhibiție medulară și periferică de liză celulară.

V. Distrugerea exagerată a elementelor la periferie :

a) Trombopenii imunologice.

b) Toxice trombocitolitice.

c) Factori infecțioși : infecții cronice, infecții de focar.

VI. Trombopenii în pancitopeniile distrofice congenitale.

a) Boala Albers-Schönberg.

b) Boala Fanconi.

VII. Trombopenii idiopatice.

VIII. Trombopenii de origine endocrină.

Boala Werlhoff

(trombocitopenie cronică idiopatică)

Boala Werlhoff este destul de frecventă și reprezintă aproximativ 10—20% din totalul bolilor hemoragice. De etiologie încă discutabilă, această boală este denumită și trombopenie cronică idiopatică.

În antecedente nu se întîlnește caracterul familial. În antecedentele personale nu se găsește nici o intoxicație medicamentoasă sau profesională sau alte cauze.

Rolul splinei în patogenia acestei boli poate fi multiplu : 1) agent producător de anticorpi ; 2) loc de distrugere a trombocitelor sensibilizate prin anticorpi ; 3) inhibitor al trombocitopoezei (hipersplenism) și trombocitodiabazei.

Manifestările clinice. Caracteristicile hemoragiilor sînt următoarele :

1. Sînt spontane sau provocate de traumatisme minime sau de intervenții : extracții dentare, amigdalectomii.

2. Echimoze și peteșii asociate, întinse pe tot corpul.

3. Epistaxis și gingivoragii.

4. Menometroragii importante și rebele.

5. Hemoragii digestive, cerebromeningiene etc.

Un caracter important este acela că debutul hemoragiilor se observă la vîrstă tînără, de obicei 5—6 ani ; ele recidivează la intervale variabile. Asocierea de echimoze și peteșii, răspîndirea petelor pe tot corpul sînt caracteristice pentru o atingere trombocitară.

Perioadele între recidive și remisiuni variază atît de la bolnav la bolnav, cît și pentru același bolnav. De obicei sindromul hemoragic încetează după 1—2 săptămîni, reapărînd după cîteva săptămîni sau luni.

Hemoragiile devin mai frecvente și mai grave la pubertate.

Splina poate fi mărită, dar de cele mai deseori este normală.

Examenul hematologic arată: *Studiul hemostazei.* — Trombocitopenie : 10 000 sau 30 000 trombocite/mm^3, cu modificări morfologice — megatrombocite.

— Iretractibilitatea cheagului.

— Timpul de sîngerare : foarte prelungit, peste 15 minute.

— Fragilitate capilară.

— Consumul de protrombină : deficitar.

— Timpul de coagulare : normal.

— Anemie.

— Leucocite : normale ca număr global și ca proporție în leucogramă.

Mielograma. Numărul de megacariocite crește, cu predominanța formelor imature ; predomină megacariocitele bazofile, iar cele granulate sînt netrombocitogene.

Studiul imunologic. În unele cazuri s-au pus în evidență anticorpi antitrombocitari.

Trombocitopenii acute

Trombocitopeniile acute se pot clasifica, în funcție de aspectul măduvei hematogene.

Trombocitopenii cu megacariocitopenie medulară se observă în :

— leucoza acută ;

— pancitopenie — aplazie medulară.

Existența acestor varietăți grave de purpure trombopenice și frecvența lor justifică necesitatea puncției sternale în trombopenii.

Trombocitopeniile cu număr normal sau crescut de megacariocite pot fi cu :

a) *Etiologie cunoscută* : trombocitopenie acută secundară ingerării de medicamente care acționează printr-un mecanism imunoalergic. Se incriminează mai des : sedormidul, chinina, chinidina.

Ancheta etiologică are o mare importanță în diagnosticul acestor forme.

Măduva arată un număr normal sau crescut de megacariocite, însă netrombocitogene. Se poate întîlni în măduvă un număr crescut de eozinofile, ceea ce pledează în favoarea unui fenomen alergic.

b) *Etiologie necunoscută* : trombocitopenie acută idiopatică (primitivă).

Clinic, atît trombopenia acută secundară, cît şi cea primitivă seamănă cu sindromul trombopenic cronic.

TROMBOCITOPATII (TROMBASTENII)

Se caracterizează printr-un număr normal de trombocite, tulburarea fiind de ordin calitativ trombocitar.

Sînt afecţiuni cu caracter familial, care se manifestă din prima copilărie.

Din punct de vedere clinic, hemoragiile au un caracter asemănător cu cele din trombocitopeniile cronice.

Trombastenia Glanzmann

Hematologic se caracterizează prin:
- timpul de sîngerare crescut;
- fragilitate capilară: prezentă;
- cheagul iretractibil;
- consum de protrombină: normal;
- rezistenţa la heparină: normală;
- test trombocitar de generare: normal.

Morfologic trombocitele prezintă anizocitoză, observîndu-se atît trombocite mici, cît şi gigante. Uneori, granulomerul lipseşte sau este condensat într-un punct.

Un caracter important este lipsa de aglutinabilitate spontană a trombocitelor, care se prezintă izolate. De asemenea, adezivitatea este foarte scăzută.

Boala Willebrand şi Jürgens

Din punct de vedere nosologic, această afecţiune este încă în discuţie. Cu evoluţia cunoştinţelor, azi se descriu mai multe forme.

Caractere comune tuturor formelor sînt următoarele:
- boala este familială;
- hemoragiile: echimoze, peteşii, gingivoragii, hemoragii uterine;
- trombocitele: numeric şi morfologic — normale;
- timpul de sîngerare: prelungit;
- retracţia cheagului: normală.

Se descriu 3 forme de boală:

a) În *forma vasculară pură*:
- timpul de sîngerare: prelungit;
- fragilitate vasculară: prezentă;
- consumul de protrombină: normal;
- testul de generare a tromboplastinei: normal.

b) În *forma cu deficienţe funcţionale trombocitare* se pune în evidenţă:
- consumul de protrombină: deficitar;
- testul trombocitar de generare a tromboplastinei: deficitar.

c) A treia formă este caracterizată prin:
- consumul de protrombină: deficitar;
- testul de generare a tromboplastinei: deficit plasmatic.

Distrofia trombocitară hemoragipară tip J. Bernard şi Soulier

Se caracterizează prin:
- timp de sîngerare: prelungit;
- retracţia cheagului: normală;
- aglutinabilitatea trombocitelor: normală;
- adezivitate: normală;
- consumul de protrombină: deficitar;
- test trombocitar de generare a tromboplastinei: deficitar.

Trombocitele sînt morfologic anormale: trombocite gigante, condensarea cromomerului.

Trombocitopatia tip Revol

În această trombocitopatie, denumită şi diaciclotrombopatie, numărul trombocitelor este normal, dar acestea au formă rotundă, contur regulat şi sînt lipsite de aglutinabilitate.

TROMBOCITEMIILE ŞI TROMBOCITOZELE

1. **Trombocitoză:** prin trombocitoză se înţelege o creştere tranzitorie a numărului de trombocite, stare temporară şi secundară unei cauze precise. Acest termen este analog în seria trombocitară cu termenul de leucocitoză în seria leucocitară.

Trombocitoza se întîlneşte curent după splenectomie, după o hemoragie, în cursul unor infecţii supurative, după traumatisme însoţite în special de fractură, după intervenţii chirurgicale, uneori în evoluţia bolii Hodgkin; de asemenea, trombocitoza se poate întîlni în cancere viscerale, în sarcoidoză, în hiperadrenalism, în atrofie splenică.

2. **Trombocitemiile:** se caracterizează printr-o creştere marcată şi permanentă a numărului de trombocite însoţită întotdeauna de o hiperplazie megacariocitară pronunţată a măduvei osoase.

Se disting două categorii de trombocitemii:

Trombocitemii secundare unui sindrom mieloproliferativ: se întîlnesc în poliglobulia esenţială, în leucemia mieloidă cronică, în splenomegalia mieloidă. Rar, trombocitemia poate fi singurul simptom care precede leucemia sau poliglobulia. Din această cauză, constatarea unei trombocitemii necesită urmărirea ei în timp, uneori multe luni sau chiar ani, înainte de a se pronunța și de a elimina definitiv diagnosticul de boală Vaquez sau leucemie mieloidă cronică cu început trombocitemic.

Trombocitemii primitive sau esențiale. Se descriu rare cazuri de trombocitemii izolate cu o creștere considerabilă a numărului de trombocite și evoluție de mai mulți ani fără modificări importante ale seriei eritrocitare sau granulocitare. Aceste cazuri foarte rare au primit numele de trombocitemii primitive sau esențiale. Se caracterizează prin : splenomegalie frecventă, mai rar și hepatomegalie.

Numărul de trombocite variază de la 500 000/$/mm^3$ pînă la cîteva milioane, prezentîndu-se aglutinate în grămezi mari, cu puternică anizocitoză, cu prezență de megatrombocite. Rar se intîlnesc megacariocite tinere în sîngele periferic sau nuclei de megacariocite.

Numărul de leucocite este crescut între 10 000 și 20 000 pe mm^3, cu neutrofile mergînd pînă la 80–90%.

Numărul de eritrocite poate fi normal sau scăzut, deseori ușoară poliglobulie.

În măduvă, numărul de megacariocite este foarte mult crescut (0,5–5% din elementele medulare nucleate) și deviere la stînga cu megacarioblaști și promegacariocite. Se întîlnește metaplazie megacariocitară în splină și ficat.

Hemostaza : se constată tromboze și hemoragii. Mecanismul hemoragiilor este complex ; în jumătatea cazurilor toleranța la heparină arată hipocoagulabilitate. Tromboplastinoformarea este întîrziată mai ales prin intervenția unor inhibitori trombocitari. Rezistența capilară poate fi diminuată. Retracția cheagului este accelerată și se poate constata o fărîmițare sau liză precoce a cheagului. Timpul de protrombină Quick poate fi normal sau prelungit în raport cu o hipoaccelerinemie. Se poate întîlni un sindrom proteolitic cu scăderea fibrinogenului și proaccelerinei.

C. SINDROAMELE HEMORAGICE DATORITE UNEI ALTERĂRI A REZISTENȚEI CAPILARE

(sindrome de origine vasculară)

Rezistența capilară poate fi diminuată de factori variați.

1. *Carențele vitaminice* care determină alterări ale pereților capilari sînt :

— avitaminoza C și P (scorbut) ;

— carențe în vitamina E.

2. *Factorii capilarotoxici* se întîlnesc în diverse boli :

a) Intoxicația azotemică : fragilitatea capilară coincide cu o azotemie moderată. O azotemie mai pronunțată, peste 1,5 g, se însoțește și de o trombopenie care agravează tendința hemoragică.

b) Fragilitate capilară la diabetici.

c) Fragilitatea capilară la hepatici : în cursul hepatitelor acute sau cronice se constată frecvent o fragilitate a capilarelor.

Se poate asocia un deficit de protrombină, proconvertină, factor Stuart, fibrinogen sau o trombocitopenie datorită unui hipersplenism asociat.

d) Fragilitate prin infecții în :

— septicemie cu meningococ : sindrom Waterhouse-Friederichsen ;

— infecții acute cu streptococ ;

— boli eruptive sau exantematice.

e) Fragilitate datorită unor factori medicamentoși : chinină, piramidon, iod, barbiturice, salicilat, sulfamide ; mecanismul de producere este toxic vasotrop sau alergic (anticorpi antiendoteliu vascular).

f) Sindromul Schönlein-Henoch : factor capilarotoxic cu caracter de anticorp.

3. *Purpura senilă* se întîlnește la aproximativ 4% din indivizii trecuți de 60 de ani : venulele dermice sîngerează datorită unei degenerescențe senile.

4. *Fragilitatea vasculară a hipertensivilor și ateromatoșilor* : hemoragii cerebrale, oculare.

5. *Purpura inelară telangiectazică,* descrisă de Majocchi.

6. *Purpure endocrine* : hiperfoliculinie.

7. *Fragilitate capilară constituțională.* Frecvent se întîlnesc antecedente familiale, cu predominanță la sexul feminin (85%). În general, afecțiunea este benignă, cu excepția posibilității de hemoragie meningiană sau oculară. Frecvent se poate evidenița un dezechiilibru neuroendocrin : instabilitate neurovegetativă, tulburări hipofizo-ovariene.

8. Fragilitate capilară în cardiopatii, insuficiență cardiacă.

SINDROMUL SCHÖNLEIN-HENOCH

(Purpura reumatoidă)

Semne clinice. Purpura este peteșială și nu se găsesc echimoze ca în trombocitopenii sau trombocitopatii. Aceste peteșii sînt mai puțin intens hemoragice : dacă nu dispar la presiune, devin totuşi mai palide. Sînt localizate în special la membrele inferioare ; rare elemente se observă la membrele superioare şi de loc pe torace sau pe faţă. Manifestările articulare iau aspect de dureri reumatice la membrele inferioare şi cedează în cîteva zile. Atît peteşiile, cît şi artralgiile sînt influenţate defavorabil de ortostatism. Manifestările digestive sînt mai rare : dureri izolate, uneori melenă sau forme pseudochirurgicale cu vărsături, meteorism (purpură abdominală Henoch). Se poate observa hematurie microscopică. Deseori există şi febră.

Histologic, capilarele apar dilatate şi cu procese de pericapilarită.

Studiul hematologic nu pune în evidenţă modificări semnificative.

Studiul hemostazei arată valori normale : timpul de sîngerare, rezistenţa capilară, retracţia cheagului sînt normale.

Numărul şi forma trombocitelor, ca şi a megacariocitelor, nu sînt modificate. Viteza de sedimentare a eritrocitelor este accelerată.

Testul capilarotoxic. Serul de bolnav suferind de purpură Schönlein-Henoch are proprietăţi capilarotoxice : injectat pe cale intradermică la cobai provoacă o echimoză locală. Se injectează la cobai intradermic 0,2—0,3 ml ser de bolnav în perioada de erupţie.

Testul nu se poate face pe om, deoarece poate determina leziuni generalizate, aşa cum se observă uneori la cobai, la care produce moartea prin purpură intestinală. Factorul capilarotoxic are caracterele unui anticorp.

Testul capilarotoxic nu este specific sindromului Schönlein-Henoch. Acţiunea capilarotoxică se observă şi în alte afecţiuni : reumatism articular acut, glomerulonefrită, tuberculoză cavitară şi se întîlneşte şi la indivizi aparent normali, testaţi ca martori în proporţie de 18% (J. Bernard, G. Mathé).

SINDROAME HEMORAGICE VASCULARE CONGENITALE

(Boala Rendu-Osler sau telangiectazia hemoragică ereditară)

Se caracterizează prin telangiectazii multiple, tendinţă la hemoragii cutanate şi mucoase, întîlnite la mai mulţi membri ai unei familii.

Primele manifestări hemoragice apar în perioada adolescentă, sub formă de epistaxisuri izolate. Telangiectaziile apar mai tîrziu, la vîrsta de 20—30 de ani, cutanate sau mucoase, cu predominanţă pe nas, buze. Mai caracteristice sînt telangiectaziile mucoase endonazale şi bucale.

Studiul hemostazei nu pune în evidenţă nici o modificare patologică. Nu se constată niciodată echimoze sau peteşii.

Pierderile cronice de sînge duc la anemie hipocromă.

D. FACTORII INHIBITORI AI COAGULĂRII

(Anticoagulanţi)

Există două categorii de inhibitori, naturali şi patologici.

1. INHIBITORII NATURALI

Factorii inhibitori naturali au un rol precis în menţinerea izocoagulabilităţii, sîngele *in vivo* păstrîndu-şi în mod normal starea fluidă, datorită unui echilibru fluido-coagulant între tendinţa la coagulare şi acţiunea anticoagulantă a inhibitorilor.

Proprietăţile generale ale inhibitorilor naturali

Inhibitorii naturali acţionează numai asupra factorilor de coagulare care sînt deja în stare activată şi nu asupra profactorilor. Cei mai studiaţi şi importanţi inhibitori naturali îşi exercită acţiunea asupra trombinei, tromboplastinei tisulare şi tromboplastinei endogene.

Nu trebuie confundată inhibiţia sau distrugerea unui factor cu consumarea normală la care sînt supuşi unii factori în timpul coagulării sîngelui. Astfel, protrombina, proaccelerina, factorul A se consumă în mod fiziologic în cursul coagulării.

Inhibitorii naturali ai coagulării sînt mult mai sensibili decît acceleratorii sau activatorii.

Recoltarea sîngelui pe oxalat de sodiu dă naştere la oxalat de calciu în stare născîndă, care adsoarbe antitrombinele II şi III. De asemenea, recoltarea pe schimbători de ioni modifică echilibrul coagulant : factorul A şi proaccelerina dispar foarte rapid, iar timpul de trombină a plasmei recoltată pe EDTA sodic este foarte prelungit.

Pentru a studia inhibitorii naturali ai coagulării, în condiţii optime, cel mai bine este să se lucreze cu ser. Dacă se utilizează plasmă, trebuie să se evite oxalatul de sodiu sau EDTA sodic ; sîngele se va recolta de preferinţă cu citrat de sodiu. Inhibitorii fiind foarte sensibili la diluţie, se va evita o diluţie prea mare în timpul recalcifierii, folosind clorura de calciu M/10 şi adăugînd un sfert faţă de volumul plasmei. De asemenea cînd se cercetează inhibitorii, este de preferat să se procedeze la îndepărtarea factorilor acceleratori, care micşorează activitatea inhibitorilor. Pentru a separa activatorii de inhibitori se adsoarbe serul cu sulfat de bariu sau fosfat tricalcic în condițiile obișnuite, inhibitorii nefiind adsorbabili.

Inhibitorii naturali ai trombinei

Trombina este adsorbită de sticlă. Se recomandă astfel ca studiul care cercetează neutralizarea sau distrugerea trombinei să se facă în tuburi siliconate.

Există mai multe antitrombine. Dintre acestea, numai antitromina III prezintă o autonomie sigură: antitrombinele I, II și IV sînt mai puțin net individualizate, iar V și VI se întîlnesc în condiții patologice.

Antitrombina I este însăși rețeaua fibrilară a cheagului, care rezultă din transformarea fibrinogenului în fibrină și care adsoarbe cantități foarte importante de trombină. Aceasta este o proprietate importantă a cheagului de fibrină, de a se opune difuzării trombinei în circulație în momentul formării cheagului.

În timpul coagulării sîngelui, o fracțiune mică de protrombină este consumată în cursul transformării fibrinogenului în fibrină, iar aproximativ 90% din trombina reziduală, nu se consumă decît în momentul cînd se produce retracția cheagului; prin eliberarea de trombină, retracția accelerează prin autocataliză transformarea protrombinei în trombină, aceasta din urmă fiind neutralizată prin antitrombina III progresivă din ser.

Antitrombina II este cofactorul heparinei. Se consideră că antitrombina III și cofactorul heparinei sînt unul și același factor. Problema însă, este departe de a fi lămurită.

Antitrombina III este cea mai importantă și bine individualizată din toate antitrombinele naturale.

Trombina în contact cu serul sanguin normal este neutralizată progresiv. Acțiunea inhibantă a antitrombinei III nu este imediată, ci se face în timp și progresiv, cere un timp de incubație, spre deosebire de heparină care acționează imediat, rapid. Din acest motiv, antitrombina III a fost denumită și antitrombină III progresivă. Antitrombina III din 1 ml ser este capabilă să neutralizeze pînă la 2 000 u. trombină. Antitrombina III este parțial consumată în cursul coagulării sîngelui. Serul nu conține decît aproximativ 50% din antitrombina plasmei. Este distrusă de solvenții lipidelor, în special de eter. Nu este adsorbită de adsorbanții uzuali, la concentrațiile obișnuite de lucru. Este relativ termostabilă: rezistă la o încălzire de 30 de minute la 56°, dar se distruge la 60°.

Antitrombina III progresivă se distinge de heparină prin caracterul ei de acțiune progresivă și prin distrugere la 60°, heparina avînd acțiune imediată și fiind rezistentă la o astfel de temperatură.

Heparina

Există o heparinemie fiziologică. Modul de acțiune a heparinei este complex. Heparina este incapabilă de a inhiba acțiunea unei trombine purificate asupra unui fibrinogen purificat. Acțiunea anticoagulantă a heparinei nu apare în această reacție decît dacă se introduce în sistem plasmă sau ser normal. Prin plasmă sau ser se aduce cofactorul heparinei, denumit și antitrombina II, absolut necesar pentru activitatea inhibantă a heparinei.

În prezența heparinei este accelerată inactivarea trombinei prin antitrombina III; cofactorul heparinei se consumă în timpul reacției.

Acțiunea heparinei se exercită atît asupra formării tromboplastinei endogene, cît și asupra formării trombinei. Acțiunea heparinei asupra complexului protrombinic se exercită aproape exclusiv asupra proaccelerinei, probabil inhibînd activatorul proaccelerinei, care este trombina. Deci, heparina se opune formării autocatalitice a trombinei și neutralizează trombina formată.

Inhibitori ai factorilor protromboplastici și tromboplastici

Inhibitorul de natură lipidică. Inhibitorul descris de Tocantins poate fi extras din creier, dar pare să fie prezent de asemenea în plasmă sau în serul normal. Pentru a-l pune în evidență, este necesar de a proteja plasma sau serul de orice contact cu sticla, deoarece acest factor este adsorbit de sticlă, ca și de amiantă. De asemenea, inhibitorul lipidic este solubil în eter și în alcool metilic. După Tocantins, acest factor este o anticefalină.

Rolul inhibitorului lipidic este încă în discuție. Tocantins crede că anticefalina joacă un rol bine determinat în echilibrul fluido-coagulant. Acțiunea anticefalinei s-ar exercita asupra factorului A, inhibîndu-i acțiunea și inhibînd formarea tromboplastinei endogene, menținînd starea de izocoagulabilitate. Tocantins afirmă că sîngele scos din organism pierde inhibitorul lipidic, care se adsoarbe pe suprafața de sticlă; factorul A fiind astfel eliberat de inhibitor poate interveni și declanșa formarea tromboplastinei endogene, deci și coagularea sîngelui. Printr-un exces din acest inhibitor, Tocantins explică patogenia hemofiliei, prin blocarea totală sau parțială a factorului A.

Un exces de cefalină brută inhibează testul de generare a tromboplastinei.

De asemenea, trombocitele în exces, care provin de la un bolnav atins de trombocitemie, întîrzie tromboplastinoformarea în testul de generare. Un exces de trombocite normale are un efect identic.

Inhibitorii tromboplastinei tisulare. Serul uman are capacitatea de a inactiva tromboplastina tisulară. Adaosul de oxalat de sodiu peste acest amestec care conține tromboplastina tisulară inactivată, restituie tromboplastinei toată activitatea. Oxalatul de calciu, care se formează, adsoarbe inhibitorul tromboplastinei tisulare.

Inhibitori ai tromboplastinei endogene. Heparina și cofactorul ei inhibează formarea tromboplastinei endogene. În testul de generare a tromboplastinei, mixtura este rapid inactivată, dacă plasma și serul se folosesc nediluate.

2. INHIBITORI PATOLOGICI AI COAGULĂRII

(Anticoagulanți circulanți)

În unele afecțiuni de etiologie foarte diferită se poate pune în evidență un inhibitor cu acțiune anticoagulantă, care duce la instalarea unei stări de hipocoagulabilitate și deci la un sindrom hemoragic.

În astfel de împrejurări, factorii coagulării sînt cantitativ și calitativ nemodificați, însă factorul inhibitor blochează acțiunea unui anumit factor al coagulării, îl neutralizează și apar tulburări hemoragice asemănătoare cu cele care survin în cazul lipsei factorului în cauză.

Inhibitorii patologici se clasifică după factorul și faza coagulării asupra căruia se manifestă acțiunea inhibantă: se descriu astfel inhibitori cu acțiune asupra primei faze a coagulării, asupra fazei a doua și asupra fazei a treia a coagulării.

Toți factorii coagulării pot avea, în mod patologic, un inhibitor.

Existența unui inhibitor se pune în evidență prin semne clinice și probe de laborator. Din punct de vedere clinic se caracterizează printr-o stare de hipocoagulabilitate cu sindrom hemoragic. Probele de laborator demonstrează existența unui inhibitor și stabilesc caracteristicile sale, precizînd asupra cărei faze și asupra cărui factor al coagulării acționează.

Elemente care evocă existența unui anticoagulant sînt următoarele:

— clinic: sindromul hemoragic este rezistent la transfuziile de sînge sau plasmă, care nu corectează tulburarea de hemostază;

— studiul hemostazei: timpul de coagulare este foarte prelungit, de asemenea timpul de recalcifiere.

Detectarea unui anticoagulant circulant, independent de natura lui, se face prin următoarele metode:

Timpul de recalcifiere a unui amestec de plasmă de la bolnav cu plasma normală în diferite proporții. Se amestecă:

Plasmă normală	(ml)	1	0,7	0,5	0,3	—
Plasmă de bolnav	(ml)	—	0,3	0,5	0,7	1
Clorură de Ca M/10	(ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Eprubetele se lasă 15 minute la 37° și apoi se adaugă clorură de calciu. Dacă există un anticoagulant în sîngele bolnavului, plasma normală nu corectează timpul de recalcifiere prelungit al bolnavului. Cu cît concentrația de plasmă de bolnav crește, cu atît timpul de recalcifiere a amestecului devine mai prelungit. Pentru a nu micșora acțiunea inhibitorului prin diluție, recalcifierea se face cu 0,25 ml Cl_2Ca M/10.

Dacă în amestecul în părți egale (1/1) al plasmei normale cu plasma de bolnav, timpul de recalcifiere este prelungit cu cel puțin 25—30 de secunde față de controlul normal, în plasma de bolnav există un anticoagulant circulant, indiferent de locul de acțiune a acestui anticoagulant.

Testul diluțiilor (*Chevalier-Fiehrer*): a se vedea la tehnici.

Inhibitorii primei faze a coagulării

Inhibitorii de tip antitrombóplastinogen. Aceștia inhibează activitatea factorilor A sau B, dînd următoarele modificări:

— timpul de coagulare: prelungit;

— timpul de recalcifiere: prelungit;

— consumul de protrombină: deficitar;

— generarea tromboplastinei: deficitară. În caz de inhibitor, antitromboplastinogen, este perturbat atît testul de generare seric, cît și cel plasmatic, ca şi cum ar fi o dublă deficienţă în factori A şi B;

— timpul de protrombină Quick: normal;

— timpul de trombină: normal;

— consumul de protrombină în amestecurile de plasmă de bolnav cu plasmă normală: se face la 30 de minute după coagularea probelor prin recalcifiere şi incubaţie la 37°. Se constată că cantităţile de 70% sau 50% plasmă normală nu sînt capabile să corecteze consumul deficitar, ceea ce dovedeşte prezenţa unui inhibitor în prima fază a coagulării.

Inhibitorii de tip antitrombocitar. Studiul hemostazei arată:

— testul de centrifugare diferenţială este negativ: plasma bogată în trombocite nu coagulează mai repede decît plasma sărăcită în trombocite prin centrifugare puternică. Atunci cînd nu este vorba de un anticoagulant antitrombocitar, plasma bogată în trombocite coagulează mai repede decît cea săracă în trombocite;

— serul bolnavului inhibează (după o incubaţie de o oră la 37°) acţiunea corectoare a unei suspensii de trombocite normală asupra unei plasme săracă în trombocite;

— consumul de protrombină: deficitar;

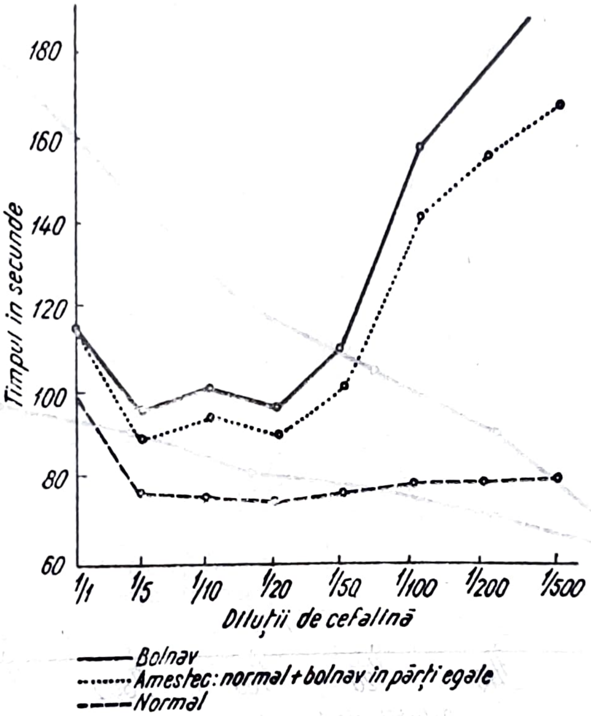


Fig. 206. — Timpul de cefalină.

— generarea de tromboplastină: deficitară (testul de generare trombocitar);

— timpul Quick: normal;

— timpul de trombină: normal;

— timpul de cefalină: recalcifierea plasmei în prezenţa unui exces de cefalină (lipoid extras din creier uman) reprezintă timpul de cefalină. Cu ajutorul acestui timp se poate detecta, dacă tulburarea este de cauză plasmatică sau trombocitară: dacă timpul de cefalină este prelungit, tulburarea este plasmatică, dacă este normal, tulburarea este de origine trombocitară. Astfel, timpul de cefalină este normal în trombopenii. În caz de anticoagulant circulant de tip antitromboplastinogen, timpul de cefalină este prelungit şi nu este corectat de o plasmă normală în cantităţi crescînde.

Inhibitorii de tip antitromboplastină. Studiul hemostazei în cazul existenţei unui inhibitor de tip antitromboplastină dă următoarele rezultate:

— timpul de coagulare: prelungit;

— timpul de recalcifiere: prelungit;

— timpul Quick: prelungit;

— dozările diferenţiale ale factorilor complexului protrombinic arată valori normale. Acest fapt se datoreşte diluţiei 1/10 a plasmei de cercetat, care se foloseşte în dozările diferenţiale, diluţie care micşorează pînă la anulare inhibitorul (spre deosebire de timpul Quick în care plasma se foloseşte nediluată);

— timpul de trombină: normal;

— proba cu diluţie a tromboplastinei tisulare: pentru cercetarea unui inhibitor de tip antitromboplastină se fac amestecuri în părţi egale de plasmă normală cu ser normal şi plasmă normală cu ser de bolnav. Atît serul normal cît şi cel de bolnav se adsorb cu sulfat de bariu (ca pentru prepararea plasmei adsorbite) pentru a pune mai bine în evidenţă acţiunea inhibitorului. Apoi se determină timpul Quick la cele două amestecuri, cu diluţii crescînde de tromboplastină. Diluţiile de tromboplastină în tampon veronal se fac: 1/1, 1/20, 1/50, 1/500, 1/1 000.

Cînd există o acţiune inhibantă (antitromboplastică) timpul Quick este mult prelungit faţă de martor, cu atît mai prelungit cu cît tromboplastina este mai diluată. Dacă inhibitorul este un antitromboplastinogen curbele se suprapun.

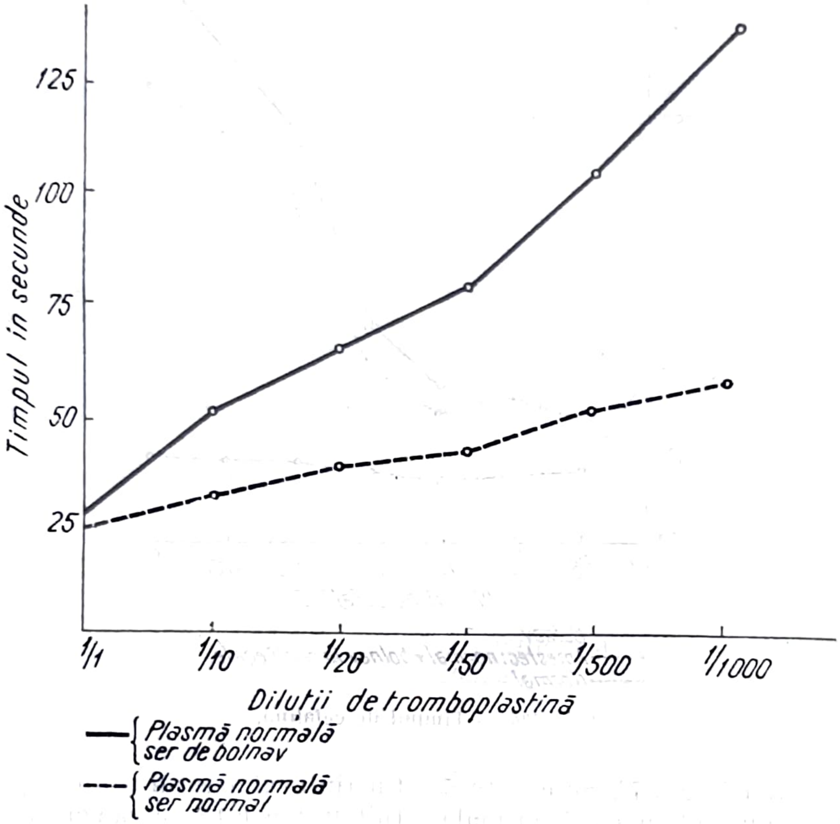


Fig 207. — Proba cu diluţia de tromboplastină tisulară.

Inhibitorii fazei a II-a a coagulării

Aceştia sînt anticoagulanţi circulanţi cu acţiune inhibitoare asupra factorilor complexului protrombinic: protrombină, proconvertină, proaccelerină.

Se caracterizează prin:

— timpul de coagulare: prelungit;

— timpul de recalcifiere: prelungit;

— timpul Quick: prelungit;

— determinarea diferenţială a factorilor: se obţin timpuri prelungite, ca în cazul lipsei factorului respectiv;

— timpul de trombină: normal;

— *important de menţionat*: spre deosebire de inhibitorii de tip antitromboplastină, care dau un timp Quick prelungit şi la dozările diferenţiale ale complexului protrombinic arată valori normale, inhibitorii fazei a II-a dau un timp Quick prelungit şi dozările diferenţiale foarte deficitare.

Inhibitorii fazei a III-a a coagulării

Inhibitorii fazei a III-a a coagulării se pot clasifica în:

1. Inhibitorii trombinei (antitrombine patologice).
2. Inhibitorii conversiunii fibrinogenului în fibrină.

Inhibitorii trombinei. Se disting două categorii :

- antitrombine neheparinice : frecvente ;
- antitrombine de tip heparinic : rare.

Caractere generale :

- timpul de coagulare : prelungit ;
- timpul de recalcifiere : prelungit ;
- timpul Quick : prelungit ;
- dozările diferențiale ale factorilor complexului protrombinic pot arăta valori normale sau ușor scăzute : diluția 1/10 a plasmei scade efectul anticoagulantului ;
- timpul de trombină : prelungit ;
- consumul de protrombină : timp prelungit.

Antitrombine neheparinice

Afirmarea prezenței unei antitrombine se bazează, în general, pe prelungirea timpului de trombină ; se găsește mai ales la bolnavii cu afecțiuni hepatice.

Timpul de trombină. Se diluează trombina în așa fel încît amestecată în părți egale cu o plasmă normală, la 37°, să dea un timp de coagulare situat între 20 și 30 de secunde. Acest timp corespunde aproximativ cu o unitate de trombină.

Exemplu : se folosesc 0,1 ml trombină și 0,1 ml plasmă.

TABELUL 89

Trombină diluată	Plasmă normală	Plasmă bolnav
1/128	20 de secunde	60 de secunde
1/256	30 de secunde	100 de secunde
1/512	50 de secunde	infinit

Important de menționat : prelungirea timpului de trombină al plasmei de bolnav nu arată numaidecît prezența unui anticoagulant circulant cu acțiune antitrombinică. O creștere a fibrinogenului dă un timp de trombină prelungit.

Se poate vorbi de o antitrombină cu acțiune anticoagulantă, numai dacă este posibil de a prelungi timpul de trombină a unei plasme normale amestecată cu plasmă de bolnav. De exemplu :

TABELUL 90

Plasmă de bolnav (ml)	Plasmă normală (ml)	Trombină (ml)	Timp (sec.)
—	0,2	0,2	20
0,2	—	0,2	40
0,1	0,1	0,2	38

Se fac amestecuri diferite între plasma de bolnav și plasma normală : 1/2, 1/4, 1/8, 1/10. Cu cît plasma de bolnav este mai concentrată, cu atît timpul de trombină a amestecului va fi mai prelungit.

La bolnavii cu afecțiuni hepatice deseori se întîmplă să se pună în evidență un timp de trombină crescut. În general însă, în aceste cazuri, adaosul unei cantități de plasmă normală, reprezentînd a zecea parte din cantitatea de plasmă de bolnav, corectează timpul de trombină patologic crescut ; această corectare exclude prezența unui anticoagulant circulant.

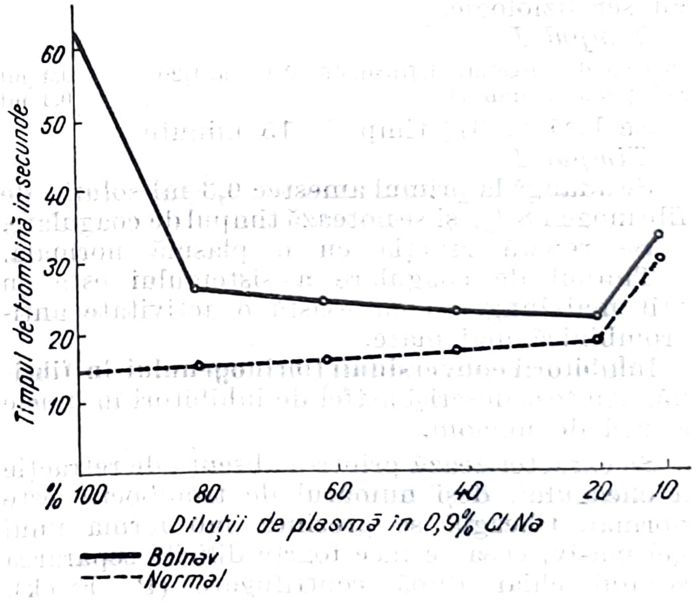


Fig. 208. — Timpul de trombină pe plasmă diluată.

Mecanismul prelungirii timpului de trombină, la hepatici, nu este încă lămurit. Este posibil, să fie în cauză diminuarea unui cofactor necesar pentru acțiunea trombinei asupra fibrinogenului.

Timpul de trombină pe plasmă diluată. Timpul de trombină, al unei plasme normale efectuat pe diferite diluții, nu se modifică la primele diluții sau crește ușor.

Timpul de trombină pe diferite diluții a unei plasme care conține un inhibitor de tip antitrombină scade brusc la primele diluții.

Timpul de trombină pe plasmă diluată se poate efectua la un amestec în părți egale de plasmă normală cu plasmă de bolnav, diluată apoi, comparativ cu o probă de amestec de plasmă normală cu ser fiziologic.

Cercetarea antitrombinei III fiziologice progresive

Ca reactiv se folosește o soluție de trombină diluată în așa fel încît să dea un timp de trombină de aproximativ 20 de secunde cu plasma normală.

Plasma de cercetat, ce provine din sînge recoltat pe citrat trisodic se defibrinează prin încălzire la 56°, timp de 3 minute, apoi se centrifughează. Supernatantul se diluează 1/20 cu ser fiziologic.

Timpul I

Plasmă de cercetat, defibrinată, diluată 1/20	0,1 ml
Soluție de trombină	0,1 ml

Se lasă la 37° timp de 15 minute

Timpul II

Se adaugă la primul amestec 0,3 ml soluție de fibrinogen 8‰ și se notează timpul de coagulare.

Se repetă reacția cu o plasmă normală. Timpul de coagulare a sistemului este cu atît mai lung, cu cît există o activitate antitrombinică mai mare.

Inhibitorii conversiunii fibrinogenului în fibrină. Au fost descriși astfel de inhibitori în unele cazuri de mielom.

Se caracterizează printr-o absență de retracție a cheagului, deși numărul de trombocite este normal. Cheagul se prezintă sub forma unui gel masiv, ceea ce face foarte dificilă separarea serului chiar după centrifugare (P. Frick).

Antitrombine de tip heparinic

Prezența acestora se caracterizează prin:

— timpul de coagulare: prelungit;

— timpul de recalcifiere: prelungit;

— timpul Quick: prelungit;

— consumul de protrombină: deficitar;

— timpul de trombină: prelungit;

— plasma de bolnav prelungește timpul de trombină a unei plasme normale.

Proba cu sulfat de protamină pentru timpul de trombină. Sulfatul de protamină, în anumită concentrație, neutralizează inhibitorul antitrombinic de tip heparinic.

TABELUL 91

Sulfat de protamină soluție 1% în diluții	Plasma (ml)	Timpul de trombină a plasmei bolnavului (sec.)	Timpul de trombină a plasmei normale (sec.)
1/1 0,1 ml	0,9	10	10
1/2 0,1 ml	0,9	10	10
1/4 0,1 ml	0,9	10	10
1/8 0,1 ml	0,9	10	10
1/16 0,1 ml	0,9	12	11
1/32 0,1 ml	0,9	13	10
1/64 0,1 ml	0,9	12	10
1/128 0,1 ml	0,9	25	9
1/256 0,1 ml	0,9	30	10
Fără sulfat de protamină —		35	10

Considerații etiologice de ansamblu asupra inhibitorilor

Inhibitorii primei faze a coagulării se întîlnesc în următoarele afecțiuni:

— În obstetrică: după nașteri normale sau după avorturi spontane se întîlnesc inhibitori ai primei faze a coagulării apărute probabil printr-un mecanism imunologic față de un antigen fetal.

— În lupusul eritematos se întîlnesc frecvent.

— Mai rar se pot întîlni în următoarele alte afecțiuni: reumatism articular acut, reumatism cronic evolutiv, dermatoze, nefropatii, hemopatii maligne, tuberculoză, hepato-splenomegalii, endocardita lentă, infarctul de miocard.

— În hemofilie: cînd inhibitorul apare la un bolnav hemofilic, mecanismul este imunologic, datorit sensibilizării bolnavului — prin transfuzii repetate de sînge sau plasmă — față de factorul antihemofilic, inhibitorul avînd toate caracterele unui anticorp (caz descris de V. Kondi și colaboratorii).

În general inhibitorii patologici sînt cîștigați și apar în afecțiuni tot cîștigate, prin reacții imunologice sau nu.

Inhibitorii fazei a doua a coagulării apar de asemenea secundar în diferite afecțiuni.

Inhibitorii fazei a treia a coagulării se întîlnesc în insuficiența hepatică, în mielomul multiplu, în colagenoze etc.

E. SINDROAMELE PURPURICE

Sindroamele purpurice se împart în:

— purpure vasculare pure;

— purpure trombocitare;

— purpure însoțite de modificări ale proteinelor plasmatice.

1. PURPURE VASCULARE PURE

Caracterele generale ale hemostazei în purpurele vasculare pure sînt :

— timpul de coagulare : normal ;
— retracția cheagului : normală ;
— timpul Quick : normal ;
— trombocitele : normale.

a) *Fără fragilitate capilară* :

În acestea :

— semnul garoului : negativ ;
— timpul de sîngerare : normal ;

Ca *forme clinice* se disting :

Purpura senilă : apare la indivizii trecuți de 60 de ani și este datorită degenerescenței senile a venulelor dermice.

Purpura inelară cu telangiectazie (Majocchi) este provocată de tromboze vasculare.

Purpurele benigne (Paul Chevalier) sînt foarte frecvente, de natură inflamatoare, însoțite de polinucleoză neutrofilă.

Purpura reumatoidă (Schönlein-Henoch).

Purpurele vasculare grave sînt :

— *purpura fulminans* Henoch : purpură difuză cu plăci necrotice, echimoze vaste, peteșii ; se întîlnesc la copil ;

— sindromul Waterhouse-Friderichsen : purpura în septicemia cu meningococ.

b) *Cu fragilitate capilară izolată* :

— timpul de coagulare, retracția cheagului, timpul Quick, trombocitele și timpul de sîngerare sînt normale ;

— semnul garoului : pozitiv.

În funcție de mecanismul patogenetic se disting :

Purpure constituționale care dau naștere la hemoragii provocate prin intervenție chirurgicală, amigdalectomie, extracție dentară. *Important* : a nu se neglija semnul garoului în explorarea hemostazei.

Purpure cîștigate se întîlnesc în :

— ateroscleroză, cu sau fără hipertensiune :
— scorbut ;
— endocardită Osler.

c) *Cu prelungirea izolată a timpului de sîngerare*

— timpul de coagulare, retracția cheagului, timpul Quick, trombocitele, semnul garoului sînt normale ;

— timpul de sîngerare : prelungit peste 10—15 minute.

Acestea sînt *purpure constituționale* de tip Willebrand, pur vasculare. Purpura este echimotică-peteșială ; studiul capilarelor a arătat că este vorba de o inerție a capilarelor (angiopatie atonică).

Se mai citează în această categorie unele *purpure cîștigate*, care se instalează după intervenții operatorii, cu astenie neuro-vegetativă, la bolnavi surmenați și obosiți și care au sîngerat abundent.

2. PURPURE TROMBOCITARE

Aici se încadrează :

— **purpurele trombocitare cu trombocitopenie** (a se vedea la trombocitopenii) ;

— **purpurele trombocitare în trombocitopatii** : (a se vedea la trombocitopatii).

3. PURPURE ÎNSOȚITE DE MODIFICĂRI ALE PROTEINELOR PLASMATICE

După A. Fiehrer, purpure plasmatice se numesc acele purpure ce se însoțesc de modificări ale globulinelor plasmei.

Lucrări recente tind a demonstra rolul capilaro toxic al unor globuline, ca și acțiunea unor proteine asupra funcțiilor trombocitare.

Se știe că trombocitele vehiculează diverse proteine ca albumine, α- și β-globuline, β_2-macroglobuline, γ-globuline, fibrinogen. Se admite că, în caz de disproteinemie sau paraproteinemie, proteinele patologice fixate pe trombocit îi modifică anumite funcții.

Se disting două categorii de purpure plasmatice : prin exces și prin deficiență în globuline.

Purpure prin exces de globuline

Purpura hiperglobulinemică Waldenström se manifestă printr-o erupție de elemente punctiforme sau lenticulare, care în cîteva zile, își pierd culoarea violacee, devenind brune, culoare care rămîne definitiv. Purpura este localizată la membrele inferioare, uneori la antebrațe sau pe dosul mîinilor ; nu apare niciodată pe mucoase. Repetarea erupției purpurice survine în mod foarte variabil.

— Studiul hemostazei arată : trombocite morfologic normale și în număr normal ; retracția cheagului, timpul de sîngerare și coagulare normale ; timpul Quick normal.

— Semnul garoului : pozitiv, afară de foarte rare cazuri cînd este negativ.

— Mielograma arată o creștere a celulelor reticulare cu creșterea numărului de plasmocite. În unele cazuri se constată o hipoplazie a seriei eritrocitare și granulocitare (frecvent există ușoară anemie).

— Dezechilibrul protidic: viteza de sedimentare a hematiilor este foarte accelerată; proteinemia este crescută. Există o hipoalbuminemie cu hiperglobulinemie considerabilă: în special sînt crescute γ-globulinele, uneori sînt ușor crescute și β și γ_2-globulinele.

Se descriu două forme:

Forma primitivă. Se caracterizează prin puseuri de purpură care se repetă timp îndelungat, luni și ani, fără alterare importantă a stării generale.

Forme secundare. Astfel de purpure însoțesc boala Besnier-Boeck-Schaumann, poliartrita cronică, reticulozele, cirozele hepatice, diabetul, tuberculoza pulmonară.

Tulburările proteinelor preced manifestările cutanate. S-a emis ipoteza că purpura este datorită absenței unei proteine indispensabile menținerii integrității capilarelor. Această ipoteză se bazează pe faptul că, în unele cazuri, transfuziile au făcut să dispară leziunile cutanate.

Purpura echimotică-peteșială cu anticoagulant circulant. Se poate pune în evidență un anticoagulant circulant. Este o purpură însoțită de hematoame, hematurie, hemoragii provocate.

Studiul hemostazei arată:

— timpul de sîngerare, retracția cheagului: normale;

— semnul garoului: negativ;

— timpul de coagulare: crescut.

Purpura din macroglobulinemia Waldenström. Studiul hemostazei în această afecțiune arată:

— timpul de sîngerare: prelungit;

— semnul garoului: pozitiv;

— timpul Quick poate fi crescut;

— V.S.H. foarte crescută (restul semnelor sînt descrise în capitolul « Reticuloze »).

Purpure prin deficit în globuline

Din acest cadru fac parte:

Sindromul Alexander: un deficit în factori antihemofilici se asociază cu o creștere considerabilă a timpului de sîngerare. În astfel de cazuri se constată un deficit în β_2-globuline.

Disprotrombie purpurică. Printre purpurile însoțite de modificări plasmatice, disprotrombiile purpurice se deosebesc prin marea lor frecvență și marele lor interes practic. Aceste forme reprezintă în general aproximativ 20% din purpure.

Ceea ce caracterizează disprotrombia este alungirea importantă și durabilă a timpului de protrombină Quick, care scoate în evidență disproteinemia, iar prezența purpurei denotă atingerea capilară-trombocitară.

În *forma de disprotrombie purpurică vasculară*, sindromul hemoragic se manifestă cu un timp de protrombină Quick prelungit, rezistență capilară scăzută, timp de sîngerare crescut, număr normal de trombocite.

În *forma de disprotrombie purpurică cu trombocitopenie*, tulburările sînt mai complexe și se însoțesc de fibrinopenie prin fibrinoliză.

Disprotrombia purpurică apare în următoarele împrejurări:

— infecții *post abortum* și *post partum* mai ales;

— cancere: prostată, pancreas;

— leucoză acută și cronică;

— leziuni hepatice cu sau fără icter;

— uremie;

— intoxicație cu dicumarol.

În uremie se asociază frecvent trombopenia. În insuficiența hepatică evolutivă scade, în primul rînd, proconvertina, apoi protrombina, factorul Stuart, iar în cele din urmă, proaccelerina. Purpura apare mai ales cînd scade factorul Stuart.

În hemopatiile maligne se poate constata o diminuare rapidă a proaccelerinei.

În disprotrombiile purpurice infecțioase și cele din neoplasme (cancer de prostată), purpura este de tip gangrenos (prin tromboze arteriolare) și apar fenomene de fibrinoliză (purpura fibrinolitică).

În intoxicațiile cu dicumarol există o atingere succesivă a proconvertinei, protrombinei, factorului Stuart și factorului IX. Purpura apare, cînd factorul Stuart scade la 2–4%. Vitamina K_1 acționează rapid, favorabil în această disprotrombie purpurică.

SEROLOGIA IMUNOHEMATOLOGICĂ

Imunohematologia are ca subiect studiul modificărilor hematologice, paralel cu studiul anticorpilor iregulari care acționează asupra elementelor sanguine figurate (eritrocite, leucocite, trombocite).

Anticorpi iregulari. Definiție. Aglutininele α și β, care caracterizează grupele sanguine clasice, se numesc anticorpi regulari, găsindu-se în mod fiziologic. Orice alt anticorp care apare în circulație și prezintă o acțiune aglutinantă sau litică asupra elementelor sanguine figurate se numește anticorp iregular.

Anticorpii iregulari sînt de două feluri:

- anticorpi iregulari care apar prin izoimunizare;
- anticorpi iregulari care apar prin autoimunizare.

În raport cu natura anticorpilor iregulari se disting, în imunohematologie, două categorii de afecțiuni:

1. Afecțiuni prin izoimunizare legate de intervenția și decelarea izoanticorpilor, în care se încadrează:

- boala hemolitică a nou-născutului;
- accidente posttransfuzionale prin incompatibilitate serologică (care survin atît prin anticorpi regulari, cît și prin anticorpi iregulari).

2. Afecțiuni prin autoimunizare legate de intervenția autoanticorpilor:

- afecțiunile seriei eritrocitare: anemii hemolitice imunologice;
- afecțiunile seriei leucocitare: leucopenii, agranulocitoze și pancitopenii imunologice;
- afecțiunile seriei trombocitare: trombopenii imunologice.

I. ANTICORPI ANTIERITROCITARI

A. CERCETAREA IZOANTICORPILOR ANTIERITROCITARI

1. DETERMINAREA GRUPELOR SANGUINE CLASICE

Determinarea grupelor sanguine se face pe lamă sau în tub, prin două probe obligatorii:

1. Determinarea aglutinogenelor.

2. Determinarea aglutininelor.

Determinarea aglutinogenelor se face cu ajutorul serurilor hemotest O (I) (α, β) A (II) (β) și B (III) (α).

Pe o lamă se pune succesiv cu pipete deosebite, cîte o picătură mare de ser hemotest în ordinea următoare: de la stînga la dreapta: O (I) la marginea stîngă, A (II) la mijloc și B (III) la dreapta.

Eritrocitele necunoscute se amestecă cu fiecare picătură de ser hemotest, în așa fel încît picătura de sînge să fie de aproximativ 10 ori mai mică decît picătura de ser. Citirea se face în primele 2–3 minute.

Interpretarea rezultatelor. Sînt posibile 4 combinații:

a) Dacă în toate 3 picăturile nu apare nici o aglutinare, amestecurile rămînînd uniform colorate în roz, sîngele de cercetat aparține grupului O (I).

b) Dacă apare aglutinare cu serurile O (I) și B (III) și lipsă de aglutinare cu serul A (II), sîngele de cercetat aparține grupului A (II).

c) Dacă apare aglutinare cu serurile O (I) și A (II) și lipsă de aglutinare cu serul B (III), sîngele de cercetat aparține grupului B (III).

d) Dacă apare aglutinare în toate serurile, atunci sîngele de cercetat aparține grupei AB (IV) (fig. 209).

Determinarea aglutininelor se face punînd în contact serul de cercetat cu eritrocite test cunoscute O (I), A (II) și B (III). Se folosesc şi eritrocite O (I) ca martori negativi pentru a înlătura greşelile datorite aglutinărilor nespecifice sau aglutinărilor specifice iregulare.

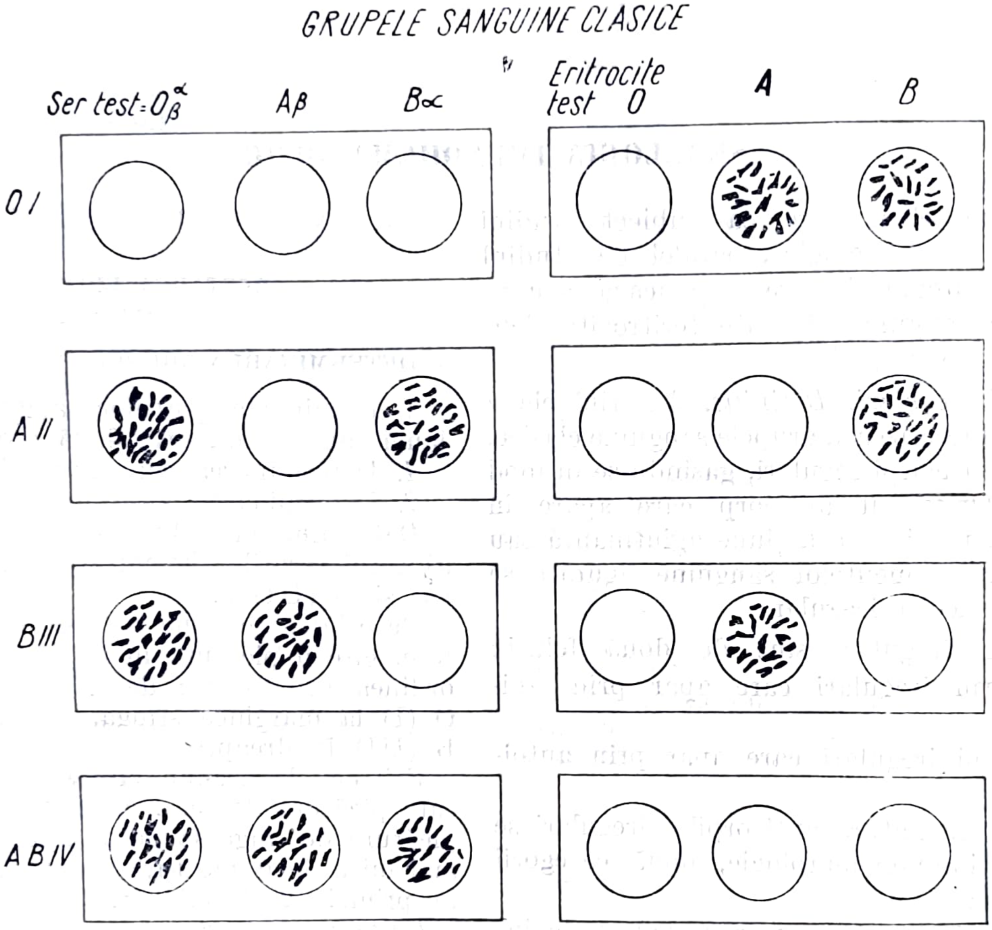


Fig. 209. — Grupele sanguine clasice. Determinarea aglutinogenelor (proba Beth-Vincent).

Fig. 210. — Grupele sanguine clasice. Determinarea aglutininelor (proba Simonin).

Pe o lamă se pun 3 picături mari din serul de cercetat. Pe prima picătură de la marginea stîngă se adaugă eritrocite test O (I). Pe picătura din mijloc eritrocite test A (II) şi pe picătura din dreapta eritrocite test B (III). Raportul dintre eritrocitele test şi picătura de ser trebuie să fie de aproximativ 1 :10. Citirea se face în primele 2—3 minute.

Interpretarea rezultatelor. Sînt 4 posibilităţi (reacţia trebuie să fie negativă cu eritrocite O (I) pentru toate cele 4 posibilităţi) :

a) apare aglutinare cu eritrocite A (II) şi B (III). Serul conţine două aglutinine α şi β, şi aparţine grupului O (I).

b) lipsă de aglutinare cu eritrocitele A (II) şi aglutinare cu B (III). Serul conţine aglutinine β şi aparţine grupului A (II).

c) Aglutinare cu eritrocite A (II) şi lipsă de aglutinare cu B (III). Serul conţine aglutinină α şi aparţine grupului B (III).

d) Nu apare aglutinare nici cu eritrocite A (II) nici cu B (III). Serul este lipsit de aglutinine α şi β şi aparţine grupului AB (IV) (fig. 210).

2. DETERMINAREA FACTORULUI Rh_0 (D)

Determinarea pe lamă

Material necesar :

— Ser anti-Rh_0 (D).

— Eritrocite cunoscute Rh + şi Rh — în suspensie în serul propriu, sîngele fiind recoltat fără anticoagulant.

— Cutie Petri cu hîrtie de filtru umezită, servind drept cameră umedă.
— Lame.
— Termostat de 37°.
— Pipeta Pasteur.
— Ac.

Recoltarea sîngelui de cercetat și a sîngelui standard cunoscut Rh + și Rh — se face în felul următor:

Sîngele de cercetat se recoltează din pulpa degetului; cu ajutorul unei pipete Pasteur se pune într-un tub de hemoliză o cantitate de 0,5—1 ml. După ce se coagulează, se sparge cheagul cu vîrful pipetei Pasteur, obținîndu-se eritrocitele necesare în suspensie în ser propriu.

Se procedează identic pentru recoltarea eritrocitelor cunoscute Rh pozitive și Rh negative. Determinarea factorului Rh$_0$ (D) se poate face și cu sîngele recoltat pe anticoagulant. În acest caz, reacția este mai slabă și apare mai tardiv.

Tehnica determinării. Pe o lamă se pune o picătură mare de ser anti-Rh, care se amestecă cu o picătură din suspensia de eritrocite de cercetat. Se amestecă cu colțul unei lame.

Pe o a doua lamă se repetă aceeași operație cu eritrocitele cunoscute Rh pozitive și Rh negative.

Lamele sînt așezate în cutia Petri, pe două baghete de sticlă. Pe fundul cutiei Petri se află o hîrtie de filtru umezită cu apă, realizînd o cameră umedă care evită uscarea picăturilor de sînge. Totul se pune în termostat și reacția se citește după 1—2 ore la 37°.

Interpretarea rezultatelor. Dacă sîngele de cercetat este aglutinat, rezultă că sîngele este Rh pozitiv. În picăturile de control, eritrocitele Rh pozitive trebuie să fie aglutinate, iar cele Rh negative nu trebuie să fie aglutinate. Lipsa de aglutinare cu eritrocitele de cercetat indică că sîngele este Rh negativ.

3. CERCETAREA ANTICORPILOR ANTI-Rh

Anticorpii anti-Rh prezintă azi o mare importanță practică și punerea lor în evidență lămurește o serie de fenomene legate de izoimunizarea provocată prin transfuzie sau sarcină. Căutarea lor se face pe baza caracterelor serologice, iar tehnicile întrebuințate sînt multiple.

Cele mai simple tehnici se bazează pe decelarea lor în mediu salin sau albuminos. Un rezultat negativ la această metodă nu echivalează cu absența anticorpilor. Se folosesc atunci tehnici mai sensibile ca testul cu eritrocite tripsinizate sau papainate, testul antiglobulinic. Cu ajutorul acestor teste, în special testul cu eritrocite papainate sau testul antiglobulinic, se pun în evidență anticorpii incompleți anti-Rh și autoanticorpii incompleți nespecifici, pentru studiul proceselor de imunitate în anemiile hemolitice.

Examenul serologic al sîngelui, care provine de la o femeie gravidă sau lehuză suspectă de izoimunizare, urmărește decelarea anticorpilor iregulari. Se stabilește în primul rînd grupa sanguină și Rh sîngelui, apoi se determină, dacă este posibil, și alți aglutinogeni. Dacă femeia este negativă față de un anumit aglutinogen se caută anticorpii iregulari cu eritrocite pozitive față de acest aglutinogen și compatibile din punctul de vedere al grupelor clasice. De exemplu, serul unei femei Rh$_0$ (D) negativă se cercetează cu eritrocite Rh$_0$ (D) pozitive izogrup sau de grupă O (I) din punctul de vedere al grupelor clasice. Dacă femeia este Rh' (C) negativ, anticorpii se caută punînd serul ei în contact cu eritrocite Rh' (C) pozitive. Dacă din punctul de vedere al grupelor clasice serul femeii este compatibil cu eritrocitele soțului, anticorpii se cercetează întotdeauna cu eritrocitele soțului, fiindcă aglutinogenul fetal care provoacă izoimunizarea este moștenit de la tată.

Atunci cînd din punctul de vedere al factorului Rh$_0$ (D) mama este pozitivă, iar izoimunizarea este provocată de alți factori pe care nu putem să-i determinăm datorită lipsei antiserului specific respectiv, căutarea anticorpilor se face cu mai multe probe de eritrocite (cel puțin 10 sau 20), compatibile ca grup clasic cu serul de cercetat, iar identificarea anticorpului necesită efectuarea a sute de probe în vederea precizării procentajului.

Determinarea în mediu salin: titrul salin

Materialul necesar:
— Serul de cercetat inactivat la 56° timp de 30 de minute.
— Eritrocite spălate O (I) Rh pozitive și O (I) Rh negative în suspensie 2% în ser fiziologic.
— Ser fiziologic.
— Tuburi de hemoliză.
— Pipete Pasteur.

Tehnica. Se fac diluții crescînde în ser fiziologic ale serului de cercetat; volumul final

0,2 ml. În toate eprubetele se adaugă cîte 0,2 ml suspensie de eritrocite 2% O (I) Rh pozitive şi stativul se pune la 37°. După 2 ore se citeşte reacţia.

Interpretare. Dacă apare aglutinare, serul de cercetat conţine anticorpi anti-Rh completi. Diluţia cea mai mare a serului care mai determină aglutinare reprezintă titrul salin al serului de cercetat.

O reacţie negativă cu eritrocitele O (I) Rh pozitive nu exclude prezenţa anticorpilor iregulari.

Aceeaşi operaţie de titrare efectuată cu eritrocite O (I) Rh negative nu trebuie să dea aglutinare. La fel, suspensia 2% de eritrocite O (I) Rh pozitive în ser fiziologic nu trebuie să prezinte aglutinare, servind ca martor negativ.

Determinarea în mediu albuminos : titrul albuminos

Materialul necesar:

— Serul de cercetat inactivat la 56° timp de 30 de minute.

— Eritrocite spălate O (I) Rh pozitive şi O (I) Rh negative, în suspensie 2% în ser uman AB (IV) lipsit de anticorpi iregulari.

— Ser uman AB (IV) lipsit de anticorpi iregulari.

— Eprubete de hemoliză.

— Pipete Pasteur.

Tehnica. Se fac diluţii crescînde în ser AB (IV) ale serului de cercetat, volum final 0,2 ml. Se adaugă în fiecare eprubetă cîte 0,2 ml suspensie de eritrocite 2% O (I) Rh pozitive în ser AB.

După 2 ore se citeşte reacţia. Dacă apare aglutinare, serul de cercetat conţine anticorpi anti-Rh. Diluţia cea mai mare a serului care mai determină aglutinare reprezintă titrul serului de cercetat.

Aceeaşi operaţie se repetă paralel în condiţii identice cu eritrocite O (I) Rh negative care nu trebuie să dea aglutinare.

Un tub de hemoliză cu 0,4 ml din suspensia de 2% de eritrocite O (I) Rh pozitive în ser AB (IV) nu trebuie să prezinte aglutinare după 2 ore de stat la termostat 37°, servind ca martor negativ.

Rezultatele obţinute prin determinarea titrului salin şi albuminos al unui ser de cercetat se interpretează în modul următor :

1. Serul dă aglutinare numai în mediu albuminos şi lipsă de aglutinare în mediu salin : conţine numai anticorpi incompleţi.

2. Serul dă aglutinare în mediu salin şi în mediu albuminos :

a) Dacă titrul salin este mai mic decît titrul albuminos, serul conţine două feluri de anticorpi, compleţi şi incompleţi.

b) Dacă titrul salin este identic cu cel albuminos, există două posibilităţi :

— prima posibilitate : serul conţine numai anticorpi compleţi ;

— a doua posibilitate : serul conţine atît anticorpi compleţi, cît şi incompleţi, însă anticorpii incompleţi sînt la un titru mai scăzut decît cei compleţi. Pentru a dovedi această posibilitate se procedează în felul următor : serul de cercetat se încălzeşte la 63°, timp de 60 de minute.

Această operaţie distruge anticorpii compleţi, lăsînd intacţi anticorpii incompleţi. Se repetă apoi o titrare în mediu salin şi albuminos. Dacă serul conţine numai anticorpi compleţi, titrul salin şi titrul albuminos scade la zero. Dacă serul conţine anticorpi compleţi şi incompleţi, titrul salin scade la zero, iar cel albuminos prezintă aglutinare la un titru mai scăzut decît titrul serului netratat prin căldură.

3. Serul nu dă aglutinare, nici în mediu salin, nici în mediu albuminos : acest rezultat poate fi datorit lipsei totale de anticorpi. Totuşi nu exclude prezenţa anticorpilor, care necesită tehnici mai pretenţioase, cu eritrocite papainate sau testul antiglobulinic. Astfel de anticorpi, denumiţi şi criptaglutinoide, se întîlnesc destul de frecvent.

4. TESTUL ANTIGLOBULINIC

(Testul Coombs-Mourant-Race)

Principiu. Se bazează pe proprietatea anticorpilor incompleţi de a se fixa pe suprafaţa eritrocitelor, fără să producă aglutinarea lor, învelind fiecare eritrocit cu un strat artificial compus din globuline-anticorpi. Astfel de eritrocite sînt aglutinate de un ser cu acţiune antiglobulinică.

Serul antiglobulinic este un ser imun de iepure (sau capră) obţinut prin imunizarea animalelor cu ser uman sau globuline serice umane. Serul brut nu se foloseşte ca atare, ci numai după îndepărtarea eteroaglutininelor îndreptate asupra eritrocitelor umane, serul rămînînd numai cu puterea antiglobulinică.

Acest rezultat se obține prin două metode: prin metoda diluției sau prin metoda adsorbției.

Metoda diluției. Se determină titrul aglutinant pe lamă al serului antiglobulinic. Dacă titrul aglutinant este de exemplu 1/64, se va folosi serul cu diluția următoare de 1/80 — 1/100. Diluția 1/80 nu dă aglutinare cu eritrocite umane, iar serul în această diluție își păstrează puterea antiglobulinică, a cărui titru atinge 1/10 000 sau 1/30 000 sau mai mult.

Metoda adsorbției. Adsorbția serului se face cu eritrocite umane de grupă A_1, B și O sau A_1B și O spălate cu ser fiziologic de 6 ori, pentru a elimina orice urmă de globuline. Se utilizează un amestec în părți egale din fiecare grupă de eritrocite spălate și sedimentate.

Un volum de ser inactivat la 56°, 30 de minute, se amestecă cu 1/2 volum eritrocite, lăsîndu-le la temperatura camerei timp de 30 — 45 de minute. Se agită des. Se centrifughează și se culege serul supernatant. Dacă serul nu posedă nici o putere aglutinantă asupra eritrocitelor umane, adsorbția este completă. În caz contrar, operația se repetă pînă ce serul nu mai manifestă nici o acțiune aglutinantă pentru eritrocite umane normale.

Testul antiglobulinic efectuat în tub este o reacție delicată, lentă și criticabilă, fiind expusă fenomenului de zonă. Pentru a evita acest fenomen, trebuie să se facă nu o singură reacție, ci o serie de reacții la diferite diluții din ce în ce mai mari. Se mai poate întîmpla ca proba în tub să dea reacții false pozitive, datorită grunzilor de sedimentare care pot fi luați drept o aglutinare adevărată.

Reacția pe lamă cîștigă din ce în ce mai mult teren prin avantajele pe care le prezintă: proba efectuată pe lamă nu expune la fenomenul de zonă, datorită folosirii unei concentrații mari în eritrocite; astfel, o picătură din sedimentul eritrocitar se amestecă pe lamă cu o picătură de ser antiglobulinic. În caz de reacție pozitivă se observă, la temperatura laboratorului, pe un fond alb luminat, apariția unei aglutinări nete în maximum 2 — 3 minute. Foarte des, aglutinarea apare masivă în cîteva secunde.

Testul pe lamă este direct și indirect.

Tehnica probei pe lamă — test indirect. În acest fel se cercetează, de exemplu, anticorpii anti-Rh_0.

Materialul necesar:

— Ser de cercetat inactivat la 56°, timp de 30 de minute.

— Eritrocite O (I) Rh_0 pozitive și Rh negative spălate de 3 ori.

— Ser antiglobulinic adsorbit.

— Ser normal inactivat fără aglutinine și fără anticorpi incompleți.

— Lame, pipete Pasteur.

Tehnica: Se procedează în felul următor:

Timpul I (sensibilizarea eritrocitelor). Două tuburi de hemoliză se numerotează cu 1 și 2.

1. În tubul nr. 1 se adaugă 0,5 ml ser de cercetat.

2. În tubul nr. 2 se adaugă 0,5 ml ser normal.

3. În tuburile nr. 1 și nr. 2 se adaugă cîte 0,25 ml o suspensie 50% de eritrocite O (I) Rh_0 pozitive.

Tuburile sînt incubate timp de 45 de minute la 37°.

Se repetă aceeași operație și cu proba de eritrocite O (I) Rh_0 negative, ca contraprobă.

Timpul II. După incubație, eritrocitele din fiecare tub se spală abundent în 3 reprize cu ser fiziologic. Se oprește numai sedimentul eritrocitar în fundul fiecărui tub. Cu ajutorul unei pipete Pasteur se amestecă pe o lamă o picătură de ser antiglobulinic cu o picătură ceva mai mică de sediment eritrocitar. Imediat după amestec, la temperatura laboratorului se citesc rezultatele.

Rezultate. Există următoarele posibilități:

1. Aglutinarea cu eritrocitele care provin din tubul nr. 1 și lipsă de aglutinare cu eritrocitele care provin din tubul nr. 2: eritrocitele au fixat un anticorp, deci serul de cercetat conține anticorpi iregulari. În caz de reacție pozitivă, aglutinarea apare în primele 6 — 10 secunde, întărindu-se după 2 — 3 minute, formînd mănunchiuri groase.

2. Lipsa de aglutinare în ambele probe: serul de cercetat nu conține anticorpi iregulari.

Eritrocitele din tubul nr. 2, cît și cele Rh_0 negative trebuie să dea întotdeauna reacție negativă după 3 minute de contact cu serul antiglobulinic.

Tehnica probei pe lamă — test direct. *Materialul necesar:*

— Sînge de cercetat recoltat pe citrat sau oxalat. Eritrocite spălate de trei ori cu ser fiziologic.

— Sînge normal recoltat și spălat în aceleași condiții.

— Ser antiglobulinic adsorbit.

— Lame, pipete Pasteur.

Tehnica. Reacția propriu-zisă constă în a amesteca direct pe o lamă o picătură de sediment din eritrocitele de cercetat cu o picătură mai mare de ser antiglobulinic.

Aceeași operație se repetă și cu eritrocitele normale.

Rezultate. Reacția pozitivă cu eritrocitele de cercetat arată prezența anticorpilor care îmbracă suprafața lor. Citirea se face în primele 10 secunde pînă la maximum 2 — 3 minute.

Reacția negativă cu eritrocitele de cercetat arată absența anticorpilor pe suprafața eritrocitelor.

Reacția trebuie să fie negativă cu eritrocitele normale.

Precauții importante în aplicarea testului Coombs

1. Serul antiglobulinic trebuie să fie titrat și cunoscut pentru acțiunea lui antigamma și antinegammaglobuline.

2. Deoarece titrul negammaglobuline este mult mai scăzut decît titrul gammaglobulină, serul se va folosi adsorbit pentru cercetarea anticorpilor negammaglobuline și nu diluat, deoarece diluția poate anula titrul antiglobulinic pentru anticorpii negammaglobuline.

3. Eritrocitele folosite pentru sensibilizare trebuie să fie proaspete, recoltate de cîteva ore și numai pe citrat trisodic.

4. Nu se vor folosi eritrocite din cheag nici pentru testul direct, nici pentru testul indirect, deoarece anticorpii la rece incompleți care se găsesc în multe seruri normale pot da reacții false pozitive.

5. Probele de sînge trebuie să stea la 37°, imediat după recoltare, pentru a se evita acțiunea anticorpilor la rece. Spălarea trebuie să se facă imediat cu ser fiziologic călduț.

6. Pentru punerea în evidență a anticorpilor negammaglobuline, serul trebuie folosit proaspăt, deoarece este nevoie de prezența alexinei, pentru a produce îmbrăcarea eritrocitelor cu astfel de anticorpi.

7. Pentru a deosebi anticorpii la cald, de cei la rece, se vor face două sensibilizări : una la 37° și alta la 18° cu eritrocite recoltate pe citrat și proaspete.

5. TESTUL CU ERITROCITE PAPAINATE

Prepararea soluției de papaină. Se prepară o soluție de papaină 1% în ser fiziologic ; se lasă 60 de minute la 37°, apoi se poate întrebuința pentru reacție. Soluția de papaină se poate păstra timp de o săptămînă la +4°. Se centrifughează înainte de întrebuințare pentru a îndepărta părțile nedizolvate.

Papainarea eritrocitelor. Eritrocitele O (I) Rh pozitive se spală de 3 ori cu ser fiziologic. Se amestecă o parte sediment eritrocitar cu 2 părți soluție de papaină. Se lasă timp de 50 de minute la 37°. Se spală imediat de 3 ori cu ser fiziologic și, din eritrocitele obținute, se face o suspensie 2% în ser fiziologic, care se pune în contact cu diluțiile de ser de cercetat în mediul salin.

După o incubație de o oră se citește reacția.

Folosirea papainei activate. Soluția de papaină activată se prepară în modul următor (tehnica Kuhus, Daily, Stratton):

I	Papaină	1
	Ser fiziologic	100 ml
II	$PO_4HNa_2 \cdot 12H_2O$	3,6 g
	Apă distilată	100 ml
III	Clorhidrat de cisteină	0,2 g
	Ser fiziologic	100 ml

Soluția I. Se obține prin decantarea lichidului supernatant după agitarea pudrei de papaină în ser fiziologic. Poate fi conservată congelată la —15°.

Soluția a II-a este o soluție tampon care poate fi conservată o lună la +4°.

Soluția a III-a este o soluție cu acțiune activatoare asupra papainei. Nu poate fi conservată decît cîteva zile la +4°.

În momentul întrebuințării se amestecă un volum din soluția I, cu un volum din soluția a II-a și cu două volume din soluția a III-a.

Acest amestec nu poate fi conservat ; constituie așa-numita ,,papaină activată''.

Prepararea eritrocitelor. Patru picături de sînge integral se adaugă în 5 ml ser fiziologic. Se spală de 3 ori. După ultima spălare se obține un sediment de eritrocite, la care se adaugă 4 picături din soluția de papaină activată. Se omogenizează și se lasă 15 minute în baie la 37°. După ce se scoate din baie, se adaugă 10 ml ser fiziologic, se amestecă bine, se centrifughează, se aruncă lichidul supernatant și eritrocitele papainate sînt gata pentru a fi folosite pentru cercetarea anticorpilor corespunzător antigenului lor.

Serul de cercetat se folosește în diluții în ser fiziologic, iar suspensia de eritrocite papainate în ser fiziologic este de 1%.

Erori de interpretare cînd se lucrează cu eritrocite papainate

Se pot obține:

Reacții fals pozitive. O aglutinare poate să fie datorită unei preparări greșite a eritrocitelor papainate, dacă ele sînt incubate cu enzimă mai mult decît trebuie. De asemenea, un anticorp fixat pe eritrocite poate să determine aglutinarea lor.

Reacții fals negative. Determinarea necesită un martor sigur pozitiv și unul sigur negativ. Reacțiile fals negative survin:

a) Dacă reactivul se învechește sau se conservă în condiții proaste.

b) Dacă spălarea eritrocitelor a fost insuficientă: urmele de ser uman pot inhiba acțiunea fermentului proteolitic datorită puterii antiproteolitice a serului uman.

c) Dacă reacția enzimatică a fost efectuată în etuvă uscată în loc de baie de apă (schimbul termic întîrziat la termostat).

B. CERCETAREA AUTOANTICORPILOR ANTIERITROCITARI

Se disting trei categorii de autoanticorpi antieritrocitari:

- Autoaglutinine.
- Autoanticorpi incompleți.
- Autohemolizine.

1. CERCETAREA AUTOAGLUTININELOR LA RECE

Sîngele se recoltează pe citrat de sodiu 3,8%, în proporție de o parte soluție de citrat pentru 4 părți sînge. Sîngele se lasă 2 ore la 37°, fiind agitat din cînd în cînd. Se centrifughează în eprubete calde la 37°, timp de 3 minute la 2 000 de ture/minut. Se separă plasma și se fac diluții crescînde de plasmă în eprubete de hemoliză în mediu de ser fiziologic, volumul final fiind de 0,2 ml. Se adaugă în fiecare eprubetă 0,2 ml suspensie 1% de eritrocite O (I) spălate în ser fiziologic. Se pot folosi eritrocitele bolnavului.

Se lasă stativul în frigider la 4° mai multe ore, 6 — 24 de ore. Citirea se face rapid, înainte de a se încălzi.

2. AUTOANTICORPI INCOMPLEȚI

Sînt anticorpi nespecifici cu acțiune aglutinantă numai în mediu albuminos sau medii macromoleculare de altă natură. Acțiunea lor se manifestă asupra eritrocitelor, indiferent de grupa sanguină și asupra propriilor eritrocite ale bolnavului. Autoanticorpii sînt adsorbabili. Se întîlnesc autoanticorpi incompleți la rece și autoanticorpi incompleți la cald. O proprietate importantă a acestor anticorpi este fixarea lor pe suprafața eritrocitelor fără să se producă aglutinarea, ceea ce permite decelarea lor cu ajutorul testului antiglobulinic direct și indirect și a testului cu eritrocite papainate.

Pentru cercetarea autoanticorpilor incompleți se folosesc teste globulare sau directe și teste serice sau indirecte.

Teste globulare sau directe

Cu ajutorul acestor teste se pun în evidență autoanticorpi fixați pe suprafața eritrocitelor bolnavului.

Testul antiglobulinic direct. Tehnica este identică ca cea descrisă în capitolul serologie pentru decelarea anticorpilor anti-Rh.

— *Pentru anticorpi incompleți la cald*: sîngele se recoltează pe citrat de sodiu soluție izotonică, în proporție de 1/5. Separarea eritrocitelor se face după o incubație de o oră la 37°, pentru a favoriza fixarea autoanticorpilor pe suprafața eritrocitelor.

Suspensia de eritrocite de bolnav o dată obținută se pune în contact cu serul antiglobulinic, după tehnica descrisă la testul antiglobulinic.

— *Pentru anticorpi incompleți la rece*: sîngele se recoltează fără anticoagulant. Separarea eritrocitelor de cheag se face după o incubație de 2 — 3 ore la 4°, pentru a favoriza fixarea autoanticorpilor la rece pe suprafața eritrocitelor. Spălarea eritrocitelor se face cu ser fiziologic rece la 4°, care favorizează fixarea anticorpilor.

Suspensia de eritrocite de bolnav se pune în contact cu serul antiglobulinic.

Autoaglutinarea în mediu plasmă-albumină O suspensie de 2% eritrocite spălate, de la bolnav, se adaugă la plasmă compatibilă amestecată cu albumină bovină. Acest mediu se prepară amestecînd 4 volume plasmă cu 1 volum albumină bovină 20%. O suspensie analogă de eritrocite normale servește ca martor. Cantitățile amestecate sînt: 0,2 ml suspensie eritrocitară pentru 0,2 ml mediu plasmă-albumină în tub. După 2 ore la 37° se face citirea.

În unele cazuri nu se observă autoaglutinarea decît cu condiția de a folosi ca mediu de suspensie propria plasmă a bolnavului, amestecată cu albumină.

Pentru autoanticorpi incompleți la rece reacția se citește după 2 — 3 ore de stat la 4° și după 24 de ore.

În lipsă de albumină bovină se folosește serul uman AB (IV).

Autoaglutinarea provocată de acțiunea fermenților papaina sau tripsina. Papaina are proprietatea de a modifica antigenii care acoperă suprafața eritrocitelor, în așa fel încît acestea devin capabile, chiar în mediu salin, de a fixa ambele extremități ale anticorpilor incompleți, provocînd aglutinarea.

Se procedează în felul următor: eritrocitele de bolnav se papainează după tehnica descrisă mai sus. Se resuspendă apoi, în suspensie 1%, în ser fiziologic sau în mediu plasmă-albumină. Se procedează identic și cu o probă de eritrocite normale. Cîte 0,5 ml din fiecare suspensie se pun într-un tub de hemoliză și se face citirea după o ședere de o oră la 37°.

Dacă eritrocitele de bolnav au fixat un anticorp *in vivo*, după papainare se autoaglutinează, fără să fie puse în contact cu serul. Eritrocitele normale trebuie să rămînă neaglutinate.

Teste serice sau indirecte

Cu ajutorul acestor teste se pun în evidență autoanticorpii incompleți liberi în ser.

Testul antiglobulinic indirect. Tehnica este identică cu cea descrisă la decelarea anticorpilor anti-Rh.

Serul bolnavului se pune în contact cu eritrocite izogrup de la alt individ. După această sensibilizare, eritrocitele se spală și se pun în contact cu serul antiglobulinic.

Pentru a evita fixarea autoanticorpilor pe propriile eritrocite ale bolnavului și diminuarea lor din ser, sîngele se centrifughează imediat după recoltare și coagulare. Pentru cercetarea autoanticorpilor incompleți la rece, serul bolnavului nu trebuie să fie inactivat, alexina favorizînd fixarea lor pe eritrocite. Cu serul neinactivat, testul antiglobulinic este mult mai intens pozitiv.

Pentru autoanticorpii incompleți la cald, alexina nu joacă nici un rol.

Aglutinarea în mediu albuminos. Ca mediu albuminos se folosește plasma umană, amestecată cu albumină bovină, în condițiile descrise mai sus, sau ser uman AB (IV). După 2 ore de stat la 37° se citește reacția. Se procedează la titrare prin diluții progresive de ser de cercetat în mediul albuminos.

Pentru autoanticorpi incompleți la rece, reacția se efectuează la 4° și se citește după 3 ore și 24 de ore.

Aglutinarea eritrocitelor papainate. Papainarea eritrocitelor se face identic, ca pentru cercetarea anticorpilor iregulari specifici.

Se face o serie de diluții de ser de bolnav, în mediu salin, volumul fiind de 0,2 ml. Se face o suspensie 1% de eritrocite papainate O (I) sau izogrup cu serul bolnavului, în mediu salin. Se adaugă în fiecare eprubetă 0,2 ml din suspensia de eritrocite papainate. După o incubație de 2 ore la 37° se citește reacția.

În cazul cînd se cercetează autoanticorpi incompleți la rece stativul se ține la 4°.

3. AUTOHEMOLIZINE

Autohemolizinele se caracterizează prin acțiunea lor nespecifică de a liza eritrocitele în anumite condiții de mediu și temperatură și în prezența complementului.

Acțiunea lor se manifestă atît asupra eritrocitelor proprii ale bolnavului, cît și asupra eritrocitelor de la alți indivizi (panhemolizine)

Se disting mai multe varietăți de panhemolizine:

Panhemolizine calde

Panhemolizinele calde acționează la temperatura corpului. Aceste hemolizine se întîlnesc în anemiile hemolitice cu autoanticorpi. Însoțesc în mod constant autoanticorpii incompleți la cald.

Punerea lor în evidență se face în felul următor:

Se lasă în termostat la 37°, mai multe zile, 2 tuburi conținînd unul plasma bolnavului amestecată cu eritrocite normale compatibile și al doilea plasmă martor de individ normal, amestecată cu eritrocitele bolnavului. Atît eritrocitele bolnavului, cît și cele normale se folosesc după spălare de 2 ori cu ser fiziologic în condiții sterile.

În mod normal, hemoliza nu se produce înainte de ziua a 3-a sau a 4-a de incubație. În cazuri patologice, hemoliza este precoce.

Cu ajutorul acestei probe se pot deosebi tulburările eritrocitului de tulburările plasmice. În cazul prezenței de hemolizine, plasma bolnavului hemolizează rapid eritrocitele normale.

Aceeași probă se poate face prin acidifierea plasmei la pH 6,9, cu ajutorul unui tampon corespunzător, mărind astfel acțiunea hemolizinelor.

La fel, întrebuințarea de eritrocite tripsinizate sau papainate mărește sensibilitatea probei.

Folosirea eritrocitelor de la bolnavi cu hemoglobinurie nocturnă paroxistică mărește de asemenea sensibilitatea reacției, aceste eritrocite comportîndu-se ca cele tratate cu papaină.

Hemolizinele calde se caracterizează mai rar prin apariția hemoglobinuriei, spre deosebire de hemolizinele reci care dau hemoglobinurie mult mai frecvent. Aceasta se datorește faptului că hemolizinele calde antrenează o hemoliză continuă, fără ca pragul renal de eliminare a hemoglobinei să fie atins, pe cînd cele reci produc, după o expunere la frig, o hemoglobinemie bruscă, cu depășirea pragului renal.

Panhemolizine reci

Panhemolizinele reci acționează la temperaturi scăzute în următoarele condiții : fixarea lor pe eritrocite se face la 4° și nu necesită prezența complementului, iar hemoliza nu survine decît la 37°, în prezența complementului.

Panhemolizinele reci se însoțesc de aglutinine reci la un titru foarte ridicat.

Se întîlnesc în următoarele împrejurări :

1. În cursul pneumoniilor virotice se întîlnesc aglutinine la rece și hemolizine la rece, care ating cel mai ridicat titru a 8-a zi și a 10-a zi. În acest moment survin accidente hemolitice manifestate prin anemie acută și uneori hemoglobinurie ; accidentele sînt trecătoare și dispar o dată cu vindecarea pneumoniei iar aglutininele și hemolizinele reci scad la un titru slab.

2. În cursul anemiilor hemolitice cronice cu hemoglobinurie paroxistică provocată prin frig și sindrom Reynaud complicat uneori cu gangrena extremităților. În astfel de cazuri se găsesc aglutinine reci însoțite de hemolizine reci.

3. În hemoglobinuriile paroxistice *a frigore*. Se disting 2 varietăți de hemoglobinurie paroxistică *a frigore* :

a) Hemoglobinurie paroxistică *a frigore* nesifilitică, însoțită de aglutinine la rece cu un titru ridicat și de hemolizine la rece.

b) Hemoglobinurie paroxistică *a frigore* sifilitică, cu hemolizine bifazice de tip Donath-Landsteiner și fără aglutinine la rece.

Hemolizine bifazice tip Donath-Landsteiner

Caracterul esențial al acestor hemolizine este legat de acțiunea în 2 faze : fixarea hemolizinei pe eritrocite se face numai la rece 4°, iar hemoliza la cald la 37°.

Prezența complementului este necesară în ambele faze ale reacției, iar fixarea hemolizinei în faza rece este cu atît mai mare cu cît complementul este în mai mare cantitate, spre deosebire de alte hemolizine la rece care se fixează pe eritrocite la temperatura de 4°, produc hemoliza la 37°, dar complementul nu este necesar decît în a doua fază a reacției.

Un alt caracter important al hemolizinelor bifazice este acela că nu sînt însoțite de aglutinine la rece sau, cînd aceste aglutinine există, au un titru slab.

Hemolizinele bifazice se însoțesc constant de o reacție Bordet-Wassermann pozitivă și nu apar decît în sifilisul terțiar. Acțiunea lor hemolizantă se manifestă asupra auto- și izoeritrocitelor și asupra eteroeritrocitelor de diferite specii animale. Scad sub influența tratamentului antisifilitic.

S-au descris foarte rare cazuri de hemolizine Donath-Landsteiner cu reacțiile serologice pentru sifilis negative. Astfel s-a stabilit că sifilisul, cu toate că este cauza cea mai frecventă în apariția acestor hemolizine, nu este totuși singura cauză.

Hemolizinele la rece și hemolizinele bifazice tip Donath-Landsteiner pot fi cercetate *in vivo* sau *in vitro*.

Cercetarea „in vivo“. Extremitățile bolnavului se expun pentru 10 — 20 de minute în apă cu gheață și apoi se cercetează hemoliza în sînge sau urină.

Se leagă baza unui deget cu ajutorul unui garou și apoi se cufundă în apă cu gheață. Se cercetează hemoliza sîngelui scos prin înțeparea pulpei acestui deget.

Probele *in vivo* trebuie evitate pentru a nu declanșa o criză hemoglobinurică, de aceea se preferă probele *in vitro*.

Cercetarea „in vitro“. Sîngele de bolnav, 2 — 3 ml, se recoltează pe anticoagulant soluție de oxalat de sodiu M/10 în proporţie de o parte oxalat pentru 9 părţi sînge.

În condiţii identice se recoltează 2 — 3 ml sînge de la un individ sănătos.

Tuburile se pun în apă cu gheaţă timp de 10 minute, apoi în apă de 37° timp de 30 de minute.

Se cercetează hemoliza în plasma supernatantă, după amestec şi centrifugare.

Greşeli de interpretare. Un rezultat negativ poate fi datorit unui titru prea slab al complementului bolnavului.

Un rezultat fals pozitiv se poate datora unui sînge care provine de la un bolnav cu hemoglobinurie nocturnă paroxistică.

Proba cu alexină

Se recoltează 10 ml sînge de la bolnav. Se amestecă 5 ml cu anticoagulant (soluţie de oxalat de sodiu); 5 ml fără anticoagulant se lasă să se coaguleze la 37°. După coagulare se centrifughează imediat şi se separă serul bolnavului. Eritrocitele recoltate pe oxalat de sodiu se spală de trei ori cu ser fiziologic, după ce au fost separate de plasmă. Se repetă identic operaţia cu sîngele unui individ sănătos care serveşte ca martor.

Se prepară o diluţie de alexină 1/10 (ser proaspăt de cobai diluat 1/10 în ser fiziologic).

Se fac următoarele amestecuri în 4 tuburi de hemoliză:

I
0,5 ml alexină
0,4 ml ser de bolnav
0,2 ml ser fiziologic
0,2 ml eritrocite de bolnav

II
0,5 ml alexină
0,4 ml ser de bolnav
0,2 ml ser fiziologic
0,2 ml eritrocite normale

III
0,5 ml alexină
0,4 ml ser normal
0,2 ml ser fiziologic
0,2 ml eritrocite de bolnav

IV
0,5 ml alexină
0,4 ml ser normal
0,2 ml ser fiziologic
0,2 ml eritrocite normale

Cele 4 tuburi se ţin 15 minute în apă cu gheaţă (pentru fixarea hemolizinelor bifazice), apoi 45 de minute în baie de 37°. Dacă serul bolnavului conţine hemolizine bifazice, apare hemoliză în tuburile I şi al II-lea; tuburile al III-lea şi al IV-lea trebuie să fie întotdeauna nehemolizate.

4. IMPORTANŢA AUTOANTICORPILOR ANTIERITROCITARI ÎN PATOLOGIE

(Anemii hemolitice imunologice)

Autoanticorpii antieritrocitari stau la baza tulburărilor hematologice care apar în afecţiunile imunologice denumite astăzi boli de autoagresiune, care împreună cu afecţiunile de izoimunizare formează capitolul imunohematologiei.

Afecţiunile de autoimunizare prin anticorpi antieritrocitari reprezintă entităţi clinice extrem de variate, a căror etiologie poate fi sau nu cunoscută. Ceea ce justifică încadrarea lor într-un singur capitol este apariţia unei anemii hemolitice imunologice în toate afecţiunile de autoagresiune.

Natura autoanticorpilor imprimă atît evoluţia anemiei, cît şi anumite caractere clinice legate direct de condiţiile de apariţie a hemolizei, astfel:

a) Creşterea titrului aglutininelor reci, însoţite de hemolizine, declanşează o anemie hemolitică printr-o hemoliză în special intravasculară, care duce deseori la hemoglobinurie sub influenţa frigului.

b) Atunci cînd intervin autoanticorpii incompleţi la cald, hemoliza este intratisulară.

Anemia hemolitică cu autoanticorpi la cald este forma cea mai frecvent întîlnită. Se întîlneşte în special la adulţi şi excepţional la copii. Anemia este mai mult sau mai puţin pronunţată, la fel icterul.

Hemoglobinuria este rară, iar cînd apare se datoreşte unei panhemolizine calde, care însoţeşte autoanticorpii incompleţi calzi.

Testele imunologice arată pananticorpi incompleţi la cald, fixaţi pe eritrocitele bolnavului sau liberi în ser.

Aceste anemii sînt simptomatice şi însoţesc anumite afecţiuni maligne ca reticulosarcomul, boala Hodgkin, limfosarcomul, leucemia limfatică.

În unele ciroze cu degenerescenţă grasă se găsesc izo- şi autohemolizine şi manifestări clinice de anemie hemolitică sau subicter, splenomegalie. Anemia este sferocitară, normocromă, cu rezistenţa osmotică, mecanică şi la căldură scăzute. Leucocitoza este crescută, trombocitele scăzute; există reticulocitoză. Bilirubinemia indirectă şi stercobilinogenul sînt crescute.

Anemia hemolitică acută cu autoanticorpi reci survine în convalescenţa unei pneumonii atipice cu virus, către ziua a 8-a—a 15-a de boală. Criza hemolitică este deseori bruscă, cu hemoglobinurie. Evoluția este scurtă și vindecarea completă.

Serologic se găsesc panaglutinine reci complete și incomplete. S-au putut pune în evidență și hemolizine reci active în special în mediu acid sau cu ajutorul eritrocitelor papainate.

Anemia hemolitică cronică cu autoanticorpi reci. Clinic este vorba de forme cronice care survin la adulți de 50 — 60 de ani, însoțite de crize de hemoglobinurie paroxistică sub influența frigului. Această formă se complică uneori cu sindrom Reynaud și gangrena extremităților.

În astfel de cazuri se întîlnesc aglutinine reci însoțite de hemolizine reci. Se crede că, la baza patogeniei sindromului Reynaud stau aglutininele, care determină formarea de aglutinate de eritrocite *in vivo*.

Hemoglobinuriile paroxistice „a frigore". Se deosebesc :

– Hemoglobinurie paroxistică *a frigore* nesifilitică cu aglutinine reci la un titru mare și cu hemolizine reci.

– Hemoglobinurie paroxistică *a frigore* sifilitică cu hemolizine bifazice tip Donath-Landsteiner și fără aglutinine reci.

Indiferent de cauza declanșatoare, hemoglobinuriile au în comun caracteristica crizei hemoglobinurice.

Existența de hemoglobină în urină fără prezență de eritrocite arată că afecțiunea nu face parte din cadrul patologiei renale, ci din cel al patologiei sanguine.

Criza hemoglobinurică cuprinde mai multe etape.

a) *Perioada de șoc inițial* se caracterizează prin adinamie, cianoza extremităților, instalarea unui frison. Respirația este rapidă și superficială, tensiunea arterială scăzută.

Sîngele prezintă o hipercoagulabilitate cu fibrinoliză accelerată, leucopenie cu trombopenie, deglobulizare.

Hemoglobina liberă în plasmă este foarte crescută : 200 pînă la 600 mg la 100 ml în loc de 5 mg, care reprezintă cifra normală. Plasma este colorată în roz.

b) *Apariția hemoglobinuriei.* Există un prag renal pentru excreția hemoglobinei, care se situează la 130 — 150 mg la 100 ml plasmă. În momentul cînd apare hemoglobinuria, fenomenele de șoc se atenuează. Se instalează o leucocitoză și trombocitoză, anemie, reticulocitoză crescută, eritroblastoză periferică uneori.

c) *Apariția icterului posthemoglobinuric.* Se constată o hiperbilirubinemie indirectă foarte ridicată, urobilinurie și creșterea stercobilinogenului.

d) *Accidente renale.* Se poate instala o anurie prin astuparea tubilor uriniferi prin detrituri eritrocitare.

Hemoglobinuria paroxistică nocturnă (*boala Marchiafava-Micheli*) a fost descrisă în capitolul „anemii". Este o afecțiune neimunologică.

Febra bilioasă hemoglobinurică survine la malarici. Se crede că ar fi posibilă intervenția unui pananticorp la rece. Cauza s-a dovedit a fi o deficiență în G-6-P-D eritrocitară, criza fiind declanșată de medicamentele antimalarice.

Anemia hemolitică acută tip Lederer-Brill se caracterizează prin febră, anemie, hemoglobinurie. Sub acțiunea transfuziilor boala se vindecă.

Serologic se pun în evidență autoanticorpi incompleți la cald sau la rece care dau un test antiglobulinic direct deseori intens pozitiv.

Virozele. O nouă etapă a fost cîștigată atunci cînd s-a precizat că anumite anemii hemolitice imunologice sînt legate de o afecțiune cu etiologie virotică. Astfel s-a arătat mai sus apariția lor în pneumonia virotică. De asemenea, ele survin în gripă, mononucleoză infecțioasă, hepatită epidemică.

Afecțiuni diverse. Se întîlnesc anemii hemolitice imunologice în : mielomul multiplu, periarterita nodoasă, nefrită, reumatismul articular acut, lupusul eritematos generalizat, cirozele hepatice.

II. ANTICORPI ANTILEUCOCITARI

A. IZOANTICORPI ANTILEUCOCITARI

Este cunoscut faptul că substanțele de grupă A și B sînt prezente și pe leucocite. Astfel, pe leucocitele indivizilor A (II) se poate pune în evidență factorul A, iar pe leucocitele indivizilor B (III) se găsește factorul B. Este vorba deci de o repartizare a factorilor sistemului O-A-B identică ca pentru eritrocite, deosebindu-se grupe leucocitare O, A, B și AB.

Pe lîngă aceste antigene există pe leucocite și alți factori încă necunoscuți suficient.

Leucoanticorpii și transfuzia. La bolnavii leucopenici, prezența antigenelor A și B și AB pe leucocite obligă să se practice transfuzii izogrup în sistemul O-A-B, fiind contraindicată folosirea grupei O (I), care agravează leucopenia prin intervenția leucoaglutininelor α sau β după caz.

Leucoaglutinine imune apar la bolnavi politransfuzați prin sensibilizare față de aglutinogene leucocitare încă necunoscute.

Leucopenii și neutropenii la nou-născut. Pînă în prezent nimic asemănător cu boala hemolitică a nou-născutului nu este cunoscut în seria leucocitară (imunizare feto-maternă). Se cunosc leucopenii și neutropenii la nou-născut însă probele serologice pentru decelarea anticorpilor antileucocitari sînt negative, probabil datorită imperfecțiunii tehnicilor actuale.

B. AUTOANTICORPI ANTILEUCOCITARI

Delimitarea între autoanticorpi și izoanticorpi imuni este astăzi greu de stabilit pentru leucocite, aglutinogenii leucocitari nefiind bine cunoscuți pînă la ora actuală.

Cercetările făcute în acest domeniu au arătat existența de leucoaglutinine, leucolizine, leucoopsonine, substanțe cu acțiune inhibantă asupra funcției fagocitare, anticorpi cu acțiune lizantă și opsonizantă asupra substanței nucleare.

Trebuie remarcat că leucopenia este rar observată singură. De cele mai multe ori, ea se însoțește de anemie și trombopenie.

Pancitopenia cronică idiopatică cu anticorpi antileucocitari prezintă următoarele caracteristice:

— Hematologic: anemie: 1 — 2 milioane de eritrocite/mm ^{3}; leucopenie: 2 000 — 3 000 leucocite/mm ^{3}; trombopenie: 100 000 de elemente/mm ^{3}; formula leucocitară arată o neutropenie: 20 — 30%.

— Măduva: la început este activă, dar această reacție nu durează mult și se instalează hipoplazia sau aplazia.

— Imunologic: se pot pune în evidență anticorpi antileucocitari (aglutinine, lizine, opsonine). În imensa majoritate a cazurilor nu se pot pune în evidență anticorpi antieritrocitari sau antitrombocitari.

— Interogatoriul nu poate stabili o intoxicație profesională, medicamentoasă sau accidentală. Nu se găsesc focare infecțioase sau neoplazice viscerale.

Pancitopenii cronice simptomatice cu anticorpi antileucocitari se observă:

a) În cursul hematopatiilor maligne: leucoze, reticulosarcom, limfosarcom, boala Hodgkin;

b) în cursul anemiilor hemolitice, cîștigate cu autoanticorpi la rece;

c) în cursul anemiilor hemolitice, cîștigate cu autoanticorpi la cald;

d) în boala Marchiafava-Micheli;

e) neutropenia periodică: cu leucoaglutinine la rece 3°.

Leucopenia în lupusul eritematos diseminat apare sub influența substanței L.E. (lupus eritematos), anticorp lizant și opsonizant activ asupra substanței nucleare.

Agranulocitoze și leucopenii prin sensibilizare alergică. Unele produse sînt capabile de a distruge direct elementele albe; este vorba de o acțiune citotoxică care nu are nimic comun cu un proces imunologic; substanța are un efect mai lent, realizînd aplazii cronice (a se vedea la „Pancitopenii"). În astfel de cazuri se vorbește de *leucopenii toxice.*

Unele produse ca piramidonul, sulfamidele etc. acționează provocînd apariția de anticorpi alergici. În *leucopeniile alergice* este vorba de sensibilizare, cînd un individ produce anticorpi, împotriva unui produs, pe cînd alți indivizi nu produc astfel de anticorpi, nu se sensibilizează.

Se crede că produsul ingerat joacă rol de haptenă (jumătate de antigen de care este legată specificitatea) care, prin combinarea cu o proteină leucocitară sau plasmatică, formează o substanță nouă, cu proprietate antigenică, capabilă să sensibilizeze organismul care răspunde prin anticorpi antileucocitari.

CERCETAREA AGLUTININELOR ANTILEUCOCITARE
(după Dausset)

Tehnica. Se prepară o suspensie de leucocite de la un individ normal care aparține grupului O (I) sau este izogrup cu sîngele bolnavului în sistemul O-A-B.

Pentru aceasta se recoltează 30 ml sînge care se defibrinează cu ajutorul perlelor.

La 20 ml sînge defibrinat se adaugă 5 ml polivinilpirolidon 3,5% și se lasă să sedimenteze timp de 30 de minute la 37°, în tub înclinat 45°. Plasma supernatantă conține 3 000 pînă la 6 000 leucocite/mm ^{3}.

La 0,1 ml ser de cercetat inactivat 30 de minute la 56° se adaugă 0,05 ml din suspensia de leucocite, într-un tub de hemoliză.

După o incubație de o oră și jumătate la 37° se adaugă 0,1 ml acid acetic 1%.

În loc de polivinilpirolidon se poate lucra și cu Dextran.

Citirea se face la microscop cu obiectivul 3. Pentru citire întrebuințăm, cu bune rezultate, o cameră obișnuită de numărat. Cu ajutorul unei pipete Pasteur se introduce în cameră o picătură din amestecul de cercetat.

Rezultate. În caz de reacție negativă, leucocitele se repartizează uniform ca într-o numărătoare de globule albe obișnuite. În caz de reacție pozitivă apar grămezi de leucocite aglutinante sub formă de ciorchine de struguri.

În reacțiile de leucoaglutinare este posibilă existența unui fenomen de zonă: astfel, într-un număr de cazuri se poate constata o aglutinare dubioasă sau negativă, cînd serul este nediluat și o reacție net pozitivă, cînd același ser este diluat 1/2 sau 1/4.

Pentru a evita fenomenul de zonă, care dă reacții negative cînd serul de cercetat se folosește concentrat, se fac diluții în ser fiziologic, începînd cu 1/2, 1/4 etc.; se pot obține în acest fel și indicații asupra titrului acestor aglutinine.

Suspensia de leucocite nu se spală.

Se face paralel un martor negativ cu un ser normal lipsit de anticorpi.

Unii autori au descris anticorpi antileucocitari la rece, în special în pneumonia virotică. Pentru a cerceta astfel de anticorpi, reacția se va face la 4°.

După experiența noastră, se poate renunța la adaosul de acid acetic. În caz de reacție pozitivă, examenul se va face cu obiectivul mare uscat pentru a deosebi morfologic aglutinarea leucocitelor de cea a eritrocitelor.

Suspensia de leucocite trebuie să fie proaspătă, preparată în ziua respectivă și conservată la 4° pînă la întrebuințare.

Serul de cercetat trebuie obligatoriu inactivat 30 de minute la 56°, deoarece serul proaspăt conține un sistem termolabil inhibitor al leucoaglutinării.

Anticorpii antileucocitari nu au o specificitate citologică. Acțiunea lor se manifestă asupra granulocitelor și asupra celulelor mononucleare. Acțiunea lor asupra elementelor leucemice este mai activă pentru seria mielocitară decît pentru cea limfocitară.

Trebuie să se facă o deosebire între fenomenul descris sub numele de leukergie și leucoaglutinare. *Leukergia* este un fenomen celular. Leucocitele unor bolnavi prezintă o tendință de a se grupa în mici grămezi de cîteva celule, indiferent de mediul în care se găsesc. În aceste grupe se găsesc celule de același tip citologic. Din contra, *leucoaglutinarea* este un fenomen seric: serul studiat posedă proprietatea de a aglutina leucocitele normale puse în contact cu el.

Folosirea sticlăriei siliconate în cercetarea leucoaglutininelor, este inutilă și chiar dăunătoare, deoarece leucocitele se fixează mai bine pe suprafețele siliconate decît pe sticlă.

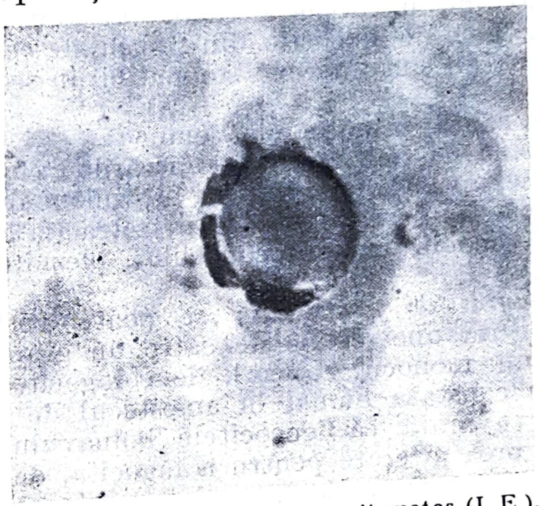


Fig. 211. — Celulă de lupus eritematos (L.E.).

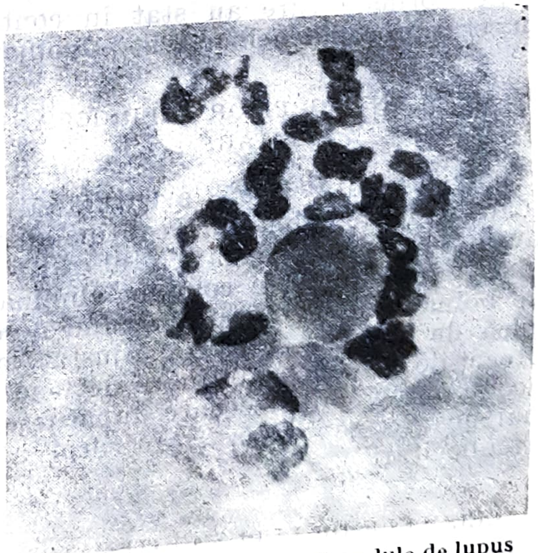


Fig. 212. — Corpi în rozetă: celule de lupus eritematos.

CERCETAREA LEUCOLIZINELOR ȘI LEUCOOPSONINELOR

(după Bessis)

Testul direct constă în examenul citologic al leucocitelor vii ale bolnavului.

Se recoltează sîngele cu citrat de sodiu 3,8% în proporție de o parte citrat pentru 9 părți sînge. Se centrifughează 30 de minute la 1 000 ture/min. Se decantează plasma, apoi stratul leucocitar este recoltat cu o pipetă punîndu-se o picătură mică între lamă și lamelă. Examenul preparatului proaspăt se face la microscopul în contrast de fază.

În condiții identice se examinează sîngele bolnavului, un sînge normal, un amestec în părți egale de leucocite din sîngele de cercetat și dintr-un sînge normal compatibil în sistemul O-A-B.

Se caută următoarele semne:

Semne de liză: oprirea mișcărilor citoplasmatice, apariția unei mișcări browniene în citoplasmă, umflarea citoplasmei, retracția nucleului, vacuolizarea mitocondriilor, pleznirea celulei.

Imagini de fagocitoză: se poate asista la fagocitoza unei celule de către un granulocit sau un monocit. Uneori, leucofagocitoza se poate constata numai în amestecul de sînge, ceea ce arată că leucocitele bolnavului sînt mult prea alterate pentru a fagocita, dar sînt în schimb opsonizate.

Testul indirect. Cercetări identice se fac pe leucocite normale care au stat în contact o oră cu serul proaspăt neinactivat al bolnavului.

CERCETAREA ANTICORPILOR ALERGICI ANTILEUCOCITARI

Se pot prezenta două eventualități:

— dacă serul de bolnav mai conține alergenul în cauză, se poate utiliza ca atare;

— dacă alergenul este complet eliminat din sîngele bolnavului, se adaugă serului o soluție izotonică de alergen în cauză, ajustat la pH 7,2. Reacțiile de leucoaglutinare de leucolizine și leucoopsonine sînt efectuate după descrierea de mai jos (a se vedea „Anticorpi alergici antitrombocitari").

CELULELE DE LUPUS ERITEMATOS

Celulele de *Lupus eritematos* sau celule L.E. (celulele Hargraves) sînt granulocite care au fagocitat alte celule și care prezintă o vacuolă mare colorată în roz.

Ceea ce caracterizează însă lupusul eritematos este proprietatea plasmei bolnavului de a determina o nucleoliză: astfel, nucleii devin omogeni și picnotici. Fagocitoza acestor nuclei lizați este secundară și definește celula caracteristică descrisă de Hargraves (fig. 211).

Fenomenul poate fi reprodus *in vitro*, punînd sîngele heparinat al bolnavului la termostat, timp de 30 de minute; se centrifughează și se fac frotiuri cu stratul leucocitar. O altă metodă folosește cheagul de sînge din care se izolează leucocitele.

Uneori se întîlnesc grămezi de granulocite în jurul unei celule cu nucleu picnotic în curs de liză, imagine care a fost denumită corp în rozetă (fig. 212). Ceea ce determină aceste modificări celulare este prezența unei substanțe cu proprietăți de anticorp lizant și opsonizant activ asupra nucleului (factorul Haserick).

Cercetarea celulelor L.E.

Testul direct. Se poate folosi sînge coagulat sau sînge heparinat sau defibrinat cu perle.

Folosirea cheagului de sînge. Sîngele recoltat fără nici un fel de anticoagulant este lăsat la termostat la 37°, timp de 2 ore. Se separă cheagul de ser, apoi cheagul este strivit cu ajutorul unei baghete pe o strecurătoare metalică cu ochiuri fine de 1 mm diametru. O astfel de strecurătoare se poate ușor improviza înțepînd cu vîrful unui ac o foaie subțire de aluminiu. Lichidul cules este centrifugat la 3 000 ture/min. timp de 15 minute, apoi iar incubat la 37° 1—2 ore. Serul supernatant hemolizat este aruncat, iar stratul celular superior, de culoare albă-roz, care conține leucocitele, este pipetat ușor. Din acest strat se întind frotiuri care se colorează cu metoda obișnuită panoptică, apoi se cercetează pentru prezența sau absența celulelor L.E. sau a imaginilor în rozetă.

Folosirea sîngelui defibrinat cu perle: 5 ml sînge defibrinat se lasă timp de 2 ore la 37°, apoi se centrifughează ca mai sus și iar se incubează timp de 2 ore. Din stratul leucocitar se fac frotiuri care se examinează ca în tehnica care folosește cheagul.

Testul indirect. Serul bolnavului este amestecat în părți egale cu un sînge total normal, compatibil și defibrinat cu perle. Acest amestec este tratat ca mai sus.

Demonstrarea fenomenului de lupus eritematos „in vivo"

(după J. F. Siklex și colaboratorii)

Cu o bandă de cauciuc se strînge baza unui deget timp de 20 de minute, provocîndu-se cianoză. Înainte de scoaterea benzii de cauciuc se înțeapă degetul și se fac 2—3 frotiuri groase care se colorează cu May-Grünwald-Giemsa. Se cercetează apoi cele 3 lame. Se consideră rezultat pozitiv, dacă se găsesc cel puțin două celule L.E. tipice sau rozete. Căutarea rozetelor se poate face și cu obiectivul mic uscat, apoi se vor cerceta și cu imersia.

III. ANTICORPI ANTITROMBOCITARI

A. IZOANTICORPI ANTITROMBOCITARI

Aglutinogenele A și B sînt prezente și pe trombocite. Transfuziile, sarcinile repetate pot provoca apariția de izoanticorpi antitrombocitari. Incompatibilitatea feto-maternă prin anticorpi antitrombocitari este demonstrată clinic, hematologic și serologic. Trombocitele posedă antigenul Rh_0 (D). Se întîlnesc astfel purpure trombopenice complicînd o boală hemolitică a nou-născutului prin incompatibilitatea Rh. Există și izoanticorpi antitrombocitari independenți de cei eritrocitari.

B. AUTOANTICORPI ANTITROMBOCITARI

Purpure trombopenice prin autoanticorpi antitrombocitari. Se pot pune în evidență aglutinine antitrombocitare sau lizine. Plasma acestor bolnavi produce o trombopenie, dacă este injectată la un individ sănătos sau la animal.

Purpura trombopenică prin autoanticorpi a nou-născutului se întîlnește în cazurile, cînd mama suferă de o purpură trombopenică cu autoanticorpi antitrombocitari, trecerea lor în circulația fetală provocînd trombopenia la făt.

Purpure trombopenice asociate cu alte afecțiuni imunologice : anemii hemolitice cîștigate. Aici se încadrează purpurele trombopenice prin sensibilizări alergice. Produsele incriminate sînt : chinina, chinidina, sedormidul, derivații de antipirină. Medicamentul sau alergenul joacă rol de haptenă în conflictul antigen-anticorp. El se fixează pe proteinele de pe suprafața trombocitelor sau pe proteinele plasmei, constituind un complex antigenic împotriva căruia organismul produce anticorpi (Ackroyd, Miescher, Moeschlin).

CERCETAREA TROMBOAGLUTININELOR

Prepararea suspensiei de trombocite normale. Se recoltează sînge normal pe următorul anticoagulant :

Sequestren Na_2	1 g
Clorură de sodiu	0,7 g
Apă distilată	100 ml

O parte anticoagulant pentru 9 părți sînge. Sîngele se centrifughează 15 minute la 800 ture/min. la 4°. Plasma supernatantă este bogată în trombocite.

Prepararea plasmei de bolnav. Sîngele de bolnav se recoltează în condiții identice, se centrifughează la 3 000 ture/min. timp de 30 de minute la 4°. Plasma de bolnav este lipsită de trombocite.

Reacția propriu-zisă. Se amestecă în eprubete de hemoliză 0,2 ml plasmă de bolnav cu 0,2 ml suspensie de trombocite. Se incubează o oră și jumătate la temperatura laboratorului. Se examinează la microscop între lamă și lamelă.

Se lucrează concomitent un martor cu o plasmă normală lipsită de trombocite.

Cercetarea tromboaglutininelor în serul bolnavului. Serul bolnavului se obține după coagularea sîngelui la 37° și după centrifugare. Serul se inactivează 30 de minute la 56°, apoi este decalcificat prin rășini schimbătoare de ioni sau prin adaos de 1 volum de soluție de oxalat de sodiu M/10 pentru 9 volume de ser. Apoi serul este adsorbit cu sulfat de bariu (a se vedea prepararea plasmei adsorbite în capitolul despre coagulare).

Serul astfel tratat se amestecă în părți egale cu suspensie de trombocite preparată ca mai sus : 0,2 ml ser cu 0,2 ml suspensie. Se lasă o oră și jumătate la temperatura laboratorului. Se examinează la microscop între lamă și lamelă. Paralel se lucrează cu un ser normal ca martor.

Notă : se recomandă ca materialul folosit pentru recoltarea sîngelui și pipetare, ca și eprubetele să fie siliconate.

Folosirea serului tratat ca mai sus dă posibilitatea decelării mai sigure a anticorpilor antitrombocitari.

CERCETAREA LIZEI TROMBOCITELOR

(după Bessis și Tabuls)

Se cercetează la microscopul cu contrast de fază, modificările citologice ale trombocitelor sub acțiunea litică a anticorpilor.

Suspensia trombocitară se obține prin sedimentare naturală a sîngelui heparinat sau citratat. Se amestecă 0,1 ml suspensie de trombocite cu 0,1 ml ser de cercetat proaspăt. Se fac două probe la 18° și la 37°. Din 10 în 10 minute se examinează între lamă și lamelă cîte o picătură de amestec, la microscopul cu contrast de fază.

Examene identice se practică cu trombocitele proprii ale bolnavului.

Liza trombocitelor survine în cîteva minute. Trombocitele se umflă, devin sferice, apar clare cu granulații negre, uneori îngrămădite. Această umflare traduce moartea celulei. În mod normal, acest fenomen se produce tîrziu, după mai multe ore.

CERCETAREA UNUI TROMBOANTICORP ALERGIC

Reacțiile precedente pot fi adoptate la cercetarea anticorpilor alergici. Acești anticorpi sînt activi numai în prezența alergenului. Este necesar de a adăuga în plasma sau în serul bolnavului o cantitate de alergen, în așa fel încît concentrația finală să fie apropiată cu cea realizată *in vivo*. Se ajunge la acest rezultat prin calcularea volumului sanguin al bolnavului in funcție de greutatea corporală și de dozele de medicament (alergen) cotidiene diluate în volumul sanguin. În practică, majoritatea medicamentelor sînt compuse. Este deci necesar de a realiza soluții cu fiecare compus în parte și cu medicamentul întreg. Soluțiile de alergen trebuie să se facă în soluții izotonice și tamponate la pH 7,2, apoi adăugate serului sau plasmei de cercetat. Se incubează serul sau plasma de cercetat cu alergenul timp de 2 ore la 37° și se procedează la fel cu un ser și o plasmă normală.

Pentru tromboaglutinare, trombocitele se lasă în contact cu serul timp de 2 ore la 37°, apoi se citește aglutinarea.

IV. CERCETAREA AGLUTININELOR ETEROFILE

Serul normal de om aglutinează eritrocitele de berbec, de oaie, de cobai, de iepure. Această proprietate se întîlnește aproape în 90% din serurile umane normale și se datorește unei eteroimunizări naturale. Anticorpii au fost denumiți eterofili și prezintă, în mod normal, față de eritrocitele de oaie un titru care variază de la 1/2 pînă la 1/64.

În 1924, Hănganuțiu descrie creșterea titrului anticorpilor eterofili naturali în *boala serului*, iar în 1932, Paul și Bunnell constată același lucru în *mononucleoza infecțioasă*.

Titrul anticorpilor eterofili crește după administrarea de ser eterolog, în special ser de cal, chiar atunci cînd boala serului nu se manifestă clinic. Aceste aglutinine naturale antieritrocite de oaie sau de la indivizii cărora li s-a administrat ser de cal sînt anticorpi Forssman și sînt adsorbite de o suspensie de rinichi de cobai care conține antigen Forssman.

Anticorpii care apar în cursul mononucleozei infecțioase nu sînt adsorbiți de organe care conțin antigen Forssman (cobai etc.): astfel, acești anticorpi sînt eterofili dar diferiți de anticorpii Forssman.

Anticorpii din mononucleoza infecțioasă sînt adsorbiți de eritrocitele de bou.

TESTUL PREZUMTIV: PAUL-BUNNELL

Această reacție a fost numită test prezumtiv, căci are valoare numai dacă titrul este de cel puțin 1/224. Cînd titrul este sub 1/224 trebuie să se facă testul diferențial.

Materialul necesar:

— Globule de oaie spălate de 3 ori, în suspensie 2% în soluție ClNa 9‰.

— Soluție ClNa 9‰.

— Serul de cercetat.

Tehnica. Serul se inactivează 30 de minute la 56°. Eritrocitele de oaie nu se utilizează înainte de 24 de ore de la recoltare, dar nici nu trebuie să fie mai vechi de două săptămîni.

1. Într-o serie de tuburi de hemoliză se fac diluțiile serului de cercetat: în primul tub se adaugă 0,4 ml soluție de ClNa 9‰, apoi în restul tuburilor cîte 0,25 ml din această soluție. În tubul nr. 1 se pune 0,1 ml ser de cercetat, apoi se fac trecerile, cu cîte 0,25 ml; diluțiile de ser sînt: 1/5, 1/10, 1/20 etc.

2. Se adaugă în fiecare tub cîte 0,1 ml suspensie 2% eritrocite de oaie. Diluția finală a serului devine: 1/7, 1/14, 1/28, 1/56, 1/112, 1/224, 1/448, 1/896, 1/1792 etc.

3. Se lasă tuburile la temperatura laboratorului timp de două ore și se citește titrul.

TESTUL DIFERENȚIAL: DAVIDSOHN-PAUL-BUNNELL

Principiu. Serul bolnavului se adsoarbe cu o suspensie de 20% rinichi de cobai: această suspensie nu adsoarbe anticorpii din mononucleoză. Serul bolnavului se adsoarbe cu eritrocite de bou: acestea adsorb complet anticorpii din mononucleoză.

Prepararea suspensiei de rinichi de cobai. Se triturează într-un mojar rinichi de cobai cu nisip fin. Se diluează în soluție ClNa 9‰ în proporție de 20%, o parte triturat de rinichi pentru patru părți soluție. Se încălzește o oră la 100°. Se adaugă 0,5 ml fenol la 100 ml. Se poate folosi și rinichi de cal în suspensie de 2%.

Prepararea suspensiei de eritrocite de bou. Sîngele de bou se defibrinează cu perle. Apoi se spală eritrocitele de 3 ori cu soluție ClNa 9‰. Se face o suspensie de 20% în soluție izotonică de ClNa. Se încălzește progresiv în baia de apă, menținîndu-se o oră la 100°. Se adaugă fenol 0,5 ml la 100 ml.

Aceste două suspensii se pot conserva mai multe luni la ghețar.

Tehnica reacției. Se procedează în felul următor:

Tubul nr. 1: se pune 1 ml suspensie de antigen de rinichi de cobai.

Tubul nr.2: se pune 1 ml suspensie de antigen de eritrocite de bou.

În fiecare tub (1 și 2) se adaugă cîte 0,2 ml ser de cercetat inactivat. Se agită, se lasă 3 minute, apoi se centrifughează 10 minute la 1 500 ture/min. Se pipetează supernatantul care trebuie să fie perfect clar.

Prima serie de tuburi: în primul tub se pun 0,25 ml supernatant adsorbit cu rinichi de cobai. În restul tuburilor se pun cîte 0,25 ml soluție 9‰ ClNa. În tubul nr. 2 se pun de asemenea 0,25 ml supernatant și din acest tub se fac trecerile pentru diluții: 1/5, 1/10, 1/20 etc.

A doua serie de tuburi: se fac diluții identice cu supernatantul adsorbit cu eritrocite de bou.

Se adaugă în cele două rînduri de eprubete cîte 0,1 ml suspensie 2% de eritrocite de oaie. Diluțiile finale ale serului de cercetat sînt 1/7, 1/14, 1/28, 1/56 etc.

Reacția de aglutinare se citește după 2 ore de stat la temperatura camerei.

Rezultate. În cazul cînd testul prezumtiv (reacția Paul-Bunnell) arată un titru de cel puțin 1/224, reacția poate fi considerată pozitivă pentru mononucleoză. Creșterea titrului în cursul bolii are valoare mai mare în favoarea acestui diagnostic.

Cînd titrul prezumtiv nu depășește 1/224, se face testul diferențial: în cazul cînd rinichiul de cobai adsoarbe anticorpii titrați în testul prezumtiv, atunci testul este negativ pentru mononucleoza infecțioasă.

Titrul aglutinant al serului după adsorbție cu rinichi de cobai scade și în caz de anticorpi de mononucleoză, însă această scădere nu trebuie să fie mai mare de 3 tuburi față de titrul original prezumtiv anti-oaie. Exemplu: titrul prezumtiv este de 1/448 titrul după adsorbție trebuie să fie cel puțin 1/56.

Reacția Paul-Bunnell-Davidsohn este aproape constant pozitivă în cursul mononucleozei infecțioase, începînd cu sfîrșitul primei săptămîni de boală. Titrul anticorpilor variază în medie între 1/1 000 și 1/2 000, dar poate să atingă și valori mai ridicate.

Trebuie semnalate două excepții: în unele cazuri, apariția anticorpilor este tardivă și reacția devine pozitivă după 15 sau 20 de zile de la instalarea bolii; de asemenea s-a constatat că, la indivizii aparținînd grupei sanguine A (II), reacția Paul-Bunnell-Davidsohn este foarte des negativă, atunci cînd mononucleoza a fost diagnosticată cu certitudine clinic și hematologic.

V. TEHNICI NEIMUNOLOGICE DE STUDIU ALE ANEMIILOR HEMOLITICE

(Hemoliza în hemoglobinuria nocturnă paroxistică)

REZISTENȚA LA ACID

Reacția Ham. Într-o eprubetă se face următorul amestec:

Ser normal proaspăt compatibil	0,95 ml
Acid clorhidric N/3	0,05 ml
Sediment de eritrocite de bolnav (spălate de 3 ori)	0,1 ml

Reacția se repetă cu ser de bolnav și cu eritrocite normale.

Eprubetele se astupă imediat cu dopuri de cauciuc și se pun în baia de apă la 37°, timp de 15 minute. Apoi se centrifughează.

În caz de hemoglobinurie nocturnă paroxistică, eritrocitele de bolnav sînt lizate atît în serul normal acidificat, cît și în serul propriu acidificat. Eritrocitele normale nu prezintă liză.

Hemoliza se apreciază cu ochiul liber, în comparație cu culoarea inițială a serului utilizat.

Reacția Crosby este un test de rezistență la acid, la care se adaugă și trombină.

Se introduc într-un tub de hemoliză 2 ml ser normal și 0,1 ml HCl N/3, apoi se adaugă 0,2 ml eritrocite de bolnav spălate.

Într-un al doilea tub, aproximativ 50 u. trombină (cîteva flocoane de pulbere de trombină), se amestecă cu 1 ml suspensie din tubul 1. Amîndouă tuburile se astupă și se lasă 15 minute la baia de 37°, apoi se centrifughează.

În mod normal, cu eritrocite normale, nu apare hemoliza.

Poate să apară hemoliză în două cazuri:

— Dacă eritrocitele sînt de la un bolnav cu hemoglobinurie paroxistică nocturnă, amîndouă tuburile prezintă hemoliză, însă în tubul cu trombină hemoliza este mai intensă.

— În caz de anemie hemolitică imunologică apare o hemoliză slabă în ambele tuburi, dar mai slabă în prezența trombinei.

REZISTENȚA LA INCUBAȚIE LA 37°

(După Dausset)

Sîngele de studiat se recoltează în două eprubete sterile, una fără anticoagulant, cealaltă conținînd o picătură de heparină. Ambele eprubete se pun la termostat la 37°. Se urmărește culoarea serului și plasmei din 2 în 2 ore, apoi după 24 de ore.

În mod normal nu survine nici o hemoliză înainte de a 3-a zi. În caz de anemie hemolitică imunologică, hemoliza poate să apară din prima zi și este egală în ambele eprubete. În acest caz de hemoglobinurie paroxistică nocturnă, hemoliza este rapidă și netă în sîngele coagulat și absentă în sîngele necoagulat.

BIBLIOGRAFIE

ALLAGILE D. — *Rev. int. Hépat.*, 1954, vol. 4, nr. 1, p.1.
ALKSEEV J. — Leucozele, diagostic și tratament, Ed. de stat pentru literatură științifică, București, 1952.
BALȘ M., VOICULESCU M. — Examene curente de laborator necesare medicului de spital, Clinica bolilor contagioase, Spitalul „Colentina", ed. a II-a, 1947.
BASERGA A. — *Sang*, 1954, vol. 25, p. 742.
BERNARD J., SELIGMANN M., WEIL M. — *Nouv. rev. franç. Hémat.*, 1961, vol. 1, nr. 1, p. 172.
BERNARD J., BESSIS M. și colab. — *Rev. Hémat.*, 1960, nr. 4, p. 341.
BERNARD J. — Maladies du sang et des organes hematopoetique, Ed. Flammarion, Paris, 1956.
BIGGS R., MC FARLANE R.G. — Human blood coagulation and its disorders, Ed. Blackwell, Oxford, 1957.
BESSIS M. — Traité de citologie sanguine, Ed. Masson, Paris, 1954.
BRU A., BOER A., BIERME R. — *Toulouse méd.*, 1962, nr. 3. p. 303.
BURGHELE TH., PAPADOPOL S., HOZOC D., BURCHI D. — *J. Urol. néphrol.*, 1961, vol. 67, nr. 12, p. 795.
CABBANNES R., RUFFIÉ J. — *Toulouse méd.*, 1962, nr. 3. p. 283.
CAEN J., YANOTTI S., VARANGOT J., BERNARD J. — *Sang*, 1959, nr. 6, p. 535.
CAZAL P. — Erythrocytes et érythropathies, Ed. Masson, Paris, 1957.
CHEVALLIER P., BERNARD J. și colab. — *Sang*, 1959, nr. 6, p. 543.
COLPRON G., LONG L.A. — *Un. méd. Can.*, 1961, vol. 90, nr. 10, p. 1 059.
DAMESHEK W., GUNZ F. — *Leukemia*, Ed. Grune and Stratton, New-York, 1958.
DAUSSET J. — Immuno-hématologie biologique et clinique, Ed. Flammarion, Paris, 1956.
DOXIADIS S. A., FESSAS PH., VALAES T. — *Lancet*, 1961, febr. 11, nr. 7 171, p. 297.
ESKENASY AL. — Anemiile, Ed. medicală, București, 1955.
GRABAR P., BURTIN P. — Analyse immuno-électrophorétique, Ed. Masson, Paris, 1960.
GÄRTNER I., NORDEN A. — *Acta med. scand.*, 1961, vol. 169, fasc., 3, p. 289.
GAUTHIER J., PROULX A., DORAY M. — *Un. méd. Can.*, 1961, vol. 90, nr. 10, p. 1 066.
GOSSELIN G., BARIBEAU G. — *Un. méd. can.*, 1961, vol. 90, nr. 10, p. 1 048.
HAYHOE F. G. I. — Leukemia research and clinical practice, Ed. Churchill, Londra, 1960.
HEILMEYER L., BEGEMANN H. — Atlas der klinischen Hämatologie und Cytologie, Ed. Springer, Berlin, Göttingen-Heidelberg, 1955.
HEREMANS J., HEREMANS M. TH. — *Acta med. scand.*, 1961, Supl. 1, vol. 367, nr. 170, p. 27.
HOLLARD D., MARTEL P., CREYSSEL R. — *Rev. franç. Et. clin. biol.*, 1962, vol. II, nr. 2, p. 192.
IONESCU V. T. — *Morfo.norm. și pat.*, 1957, nr. 3, p. 25.
IONESCU V. T., ILIESCU FLORICA, DUȚU RODICA — *Morfol. norm. și pat.*, 1958, nr. 3, p. 235.
IONESCU V. T., DĂNICEL M. — Studii și cercetări clinice și experimentale de oncologie, Ed. medicală, București 1958, p. 53.
IONESCU V. T. — *Viața med.*, nr. 1, 1959, p. 35.
IONESCU V. T. — Îndreptar pentru citodiagnosticul precoce al cancerului, Ed. medicală, București, 1957, p. 60.
IONESCU V. T. — *Morfol. norm.* și *pat.*, 1961, nr. 2, p. 143.
IONESCU V. T. — *Med. internă (București)*, 1961, nr. 9, p. 1 267.
IZARU P., PALEIRAC G., MOUGUIOT G. — *Montpellier méd.*, 1959, nr. 4, p. 279.
KOLLER F. — *J. Physiol. (Paris)*, 1961, vol. 53, nr. 1, p. 131.
KOLLER F. — *Dtsch. med. Wschr.*, 1956, nr. 14, p. 516.
KONDI V. — Leucograma în sarcină și lăuzie, teză de doctorat I.M.F., București, 1949, nr. 1 573.
KONDI V., IACOBESCU A. — *Rev. Fiziol.*, 1956, nr. 3, p. 377.
KONDI V., POPESCU E. R. — Transfuzia de sînge, Ed. medicală, București, 1956.
KONDI V., IACOBESCU A., MITRICĂ NATALIA, BĂLAN ST. — *Med. internă, (București)*, 1959, nr. 11, p. 1751.
KONDI V. — *Viața med.*, 1959, nr. 7, p. 651.
KONDI V., BĂLAN ST., IACOBESCU A., MITRICĂ NATALIA — *Med. internă, (București)*, 1959, nr. 1, p. 120.

KONDI V., IACOBESCU A., BĂLAN ST., FODOR GH., MITRICĂ N. — *Med. internă, (București)*, 1960, nr.3, p. 453.

KONDI V., IACOBESCU A., BĂLAN ST., MANICATIDE E. T. — *Med. internă (București)*, 1960, nr. 12, p. 1 913.

KONDI V., IACOBESCU A., BĂLAN ST. — *Med. internă (București)*, 1961, nr. 3, p. 471.

KONDI V., GRIGORIU GH., IACOBESCU A., BĂLAN ST., PRETORIAN M., MITRICĂ NATALIA — *Med. internă (București)*, 1962, nr. 10, p. 1 225.

KONDI V., MITRICĂ NATALIA — Probleme de actualitate în medicină, Ed. medicală, București, 1960.

KONDI V., MITRICĂ NATALIA — Probleme de actualitate în medicină, Ed. medicală, București, 1961.

KONDI V., IACOBESCU A., BĂLAN ST., — *Nouv. Rev. franç. d'Hematologie*, 1962, nr. 6, p. 919.

LAURELL C. B., WALDENSTROM J. — *Acta med. scand.*, 1961, Suppl. 367, vol. 170, p. 97.

LARRIEU M. J., SOULIER J. P., CULOT Y. — *Sang*, 1957, nr. 2, p. 152.

LARRIEU M. J., WEILLAND C. — *Rev. Hématol.*, 1957, nr. 12, p. 199.

LÜSCHER E. F., BETTAX-GALLAND M., — *J. Physiol. (Paris)*, 1961, vol. 53, nr. 1, p. 145.

MALASSENET-R. — *Rev. Hématol.*, 1957, nr. 12, p. 64.

MARINESCU V., LITARCZEK GH ., FĂȚĂRȚESCU GABRIELA, CRISTEA I. — *Chirurgia (București)*, 1962, nr. 3, p. 333.

MATHIEU J., LACOMBE M. — *Un. méd. Can.*, 1961, nr. 10, T. 90, p. 1 080.

NICOARĂ S. T. — Diagnosticul diferențial citochimic al leucozelor, Referat general, Centrul de hematologie, București, 1963.

NICOLAU C. T. — Hematologie, Ed. medicală, București, 1959.

NICOLAU C. T., NICOARĂ S. T. și colab. — *Med. internă, (București)*, nr. 10, p. 1 173.

ORLOVA L. D. — *Probl. Gemat.*, 1961, nr. 10, p. 22—29.

PAPADOPOL Ș., BURCHI DOINA — *Chirurgia (București)*, 1962, nr. 10, p. 917.

PEARSE A. G. E. — Histochemistry. Theoretical and applied, ed. a 2-a, Ed. Little Brown, Boston, 1961.

POPESCU R. E. — Fiziopatologia fierului. Anemiile hipocrome. Ed. medicală, București, 1958.

POPESCU R. E., IONESCU GH. M. — *Viața med.*, 1960, nr. 10, p. 773.

POPPA C., APĂTEANU V., NICOARĂ S., GRIGORIU G. — *Med. internă*, 1960, 3, p. 387.

RAYNAUD R., BROCHIER M. — *Sem. Hôp. Paris*, 1958, nr. 28, p. 977.

ROSKAM J., HUGUES J., BOUNAMEAUX Y. — *J. Physiol., Paris*, 1961, vol. 53, nr. 1, p. 175.

ROYER A. — *Un. méd. Can.*, 1961, nr. 10, p. 1 126.

SĂSĂRMAN MARIA — *Med. internă (București)*, nr. 8, p. 1 187.

SHEEHAN H. I., STOREY G. W. — *J. Path. Bact.* 1947, vol. LIX, nr. 1—2, p. 336.

SOULIER J. P., LARRIEU M. J. — Les anticoagulants en thérapeutique, Ed. Doin, Paris, 1955.

SOULIER J. P. — *Sang*, 1959, nr. 30, p. 262.

SOULIER J. P., LE BLOCH A. G. — *Rev. Hématol.*, 1950, nr. 5, p. 148.

STORTI E. — Diagnostique des maladies du sang, Ed. Doin, Paris, 1959.

TEODORESCU P., SĂSĂRMAN MARIA, IONĂȘESCU GABI — *Med. internă (București)*, 1962, nr. 3, p. 317.

TUDORANU GH., BRĂTIANU A., NICULESCU M. — — Metode de explorare de laborator în bolile sistemului hematopoietic și ale sîngelui, Ed. medicală, București, 1959.

TUDORANU GH., POPA GH., POPOVICI MARIA, ROSIN ANGELA, MIHAIL E., VĂCARU OLIMPIA — — *Med. internă, (București)*, 1962, nr. 10, p. 1 153.

ȚUSINSKAIA M. M., URINSON I. P. — *Probl. Gemat.* perel. Krovi, 1961, nr. 8, p. 23—30.

URINSON I. P., TUSINSKAIA M. M. — *Probl. Gemat.* 1961, nr. 7, p. 25—30.

VÎLCU AL. — *Viața med.*, 1960, nr. 4, p. 303.

VOICULESCU V., IONESCU I. — *Viața med.*, 1960, nr. 6, p. 481.

WINTROBE M. — Clinical Hematology, ed. a 5-a, Ed. Lea și Febiger, Philadelphia, 1961.

Dr. IEREMIA TIBERIU

BACTERIOLOGIE

*

Pentru a realiza o prezentare judicioasă a metodelor diagnosticului bacteriologic în concordanţă cu necesităţile actuale, trebuie să se aibă în vedere faptul că medicul specialist de laborator nu este obligatoriu de formaţie bacteriolog.

Această constatare impune o succesiune în tratarea problemelor care să permită prezentarea metodelor generale de lucru în domeniul bacteriologiei medicale, urmate de metodele speciale ale diagnosticului de laborator al fiecărei infecţii.

În partea de bacteriologie a manualului, metodele generale sînt reprezentate de : metodele de microscopie, sterilizare şi dezinfecţie, examenul preparatelor microbiene, metodele de cultivare a microbilor, recoltarea produselor patologice, însămînţarea şi izolarea microbilor, testarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice, metodele imunologice de diagnostic şi ale infecţiei experimentale.

Partea de metodologie generală este urmată de 2 capitole de sinteză : unul care tratează despre relaţiile ecologice ale organismului uman cu flora mediului înconjurător şi ca expresie a acestor interrelaţii flora normală a organismului ; al doilea capitol prezintă o sinteză a principalelor produse patologice din infecţiile umane şi discută variatele posibilităţi de diagnostic etiologic.

Metodologia specială a diagnosticului de laborator al fiecărei infecţii este descrisă în contextul de ansamblu al infecţiei cu accentul pe caracteristicile agentului infecţios şi ale etapelor diagnosticului de laborator. Diagnosticul de laborator al fiecărei infecţii în parte se încheie cu tabele schematice privind etapele succesive ale diagnosticului, diferenţiate pe produsele patologice caracteristice.

Indicaţiile bibliografice au fost selecţionate în aşa fel, încît să ofere posibilitatea de a completa şi adînci aspecte care interesează, în mod deosebit, pe specialistul de laborator clinic şi care nu au putut fi desvoltate în limitele lucrării.

La alcătuirea bibliografiei au fost folosite cu precădere manualele clasice în limbile internaţionale, rusă, engleză, franceză şi germană, unele monografii şi lucrările de specialitate romîneşti.

În aceeaşi ordine de idei, pentru a face mai accesibilă folosirea indicaţiilor bibliografice, ele au fost defalcate şi adăugate după fiecare capitol.

Discuţiile directe cu colegii medici primari de laborator clinic din provincie şi Capitală, prilejuite de Sesiunea de concursuri şi examene a Ministerului Sănătăţii şi Prevederilor Sociale din septembrie 1962 şi sugestiile lor critice au constituit un stimulent şi un sprijin moral pentru îmbunătăţirea actualei ediţii.

Ca orice început, şi acesta este legat de o serie de neajunsuri, de aceea observaţiile critice şi sugestiile cititorilor le vom considera ca o manifestare de interes pentru lucrare.

*

METODELE GENERALE DE STUDIU AL BACTERIILOR

MICROSCOPUL ŞI METODELE DE MICROSCOPIE ÎNTREBUINŢATE ÎN MICROBIOLOGIE

Microbii sînt fiinţe cu dimensiuni foarte mici, de cîteva miimi de milimetru; ei nu pot fi văzuţi cu ochiul liber şi necesită un instrument optic cu o acuitate vizuală mai mare decît a ochiului uman. Microscopul este aşadar unealta de bază a studiului microbiologiei.

Din punct de vedere practic se cunosc astăzi 3 categorii de microscopie : microscopia clasică optică, mai corect fotonică, care utilizează spectrul luminii vizibile cu cele 2 extremităţi ale sale, infraroşu şi ultraviolet. În acest caz, fotonii radiaţiilor luminoase sînt folosiţi pentru a forma imaginea. Cea de-a doua categorie este reprezentată de microscopia electronică, care face apel la fascicule de electroni pentru a forma imaginea. O a treia categorie este microscopia ionică, care foloseşte protonii, cum sînt de pildă ionii atomilor uşori de litiu. Microscopia ionică fiind de dată mai recentă se găseşte în faza experimentală şi nu are încă aplicaţii practice.

Microscopia fotonică

Orice microscop are ca scop mărirea imaginii unui obiect supus observaţiei. Mărirea este raportul dintre dimensiunile liniare ale imaginii şi ale obiectului. Două obiecte, unul mare, altul mic, de altfel identice, se deosebesc prin unghiul vizual sub care se prezintă observatorului. Pentru ,,a mări'' un obiect mic sau, mai corect spus, pentru a provoca mărirea aparentă a dimensiunilor sale, trebuie să creştem unghiul sub care cad razele în ochiul observatorului. Un mijloc des aplicat în viaţa zilnică constă în a apropia obiectul de ochi, dar procedeul este limitat de posibilităţile restrînse de acomodare ale ochiului. Mai practică şi eficace este intercalarea unei lentile convergente în traiectul razelor. Folosirea unui sistem de lentile realizează microscopul fotonic. Pentru a folosi lentilele în condiţii optime trebuie corectate principalele defecte ale lentilelor, denumite ,,aberaţii''.

Defectele lentilelor şi corectarea lor. *Aberaţia sferică şi cromatică.* Din punctul de vedere al formării imaginilor, lentilele prezintă o serie de imperfecţiuni sau aberaţii, cu atît mai accentuate, cu cît puterea de convergenţă este mai mare. Fără corectarea acestor defecte se obţin imagini deformate, neclare, cu conturul vag şi cu marginile colorate.

Un prim defect este *aberaţia sferică;* în loc ca razele paralele cu axa optică să se întîlnească toate într-un singur punct, cele periferice se reunesc mai aproape de lentilă decît cele centrale. Imaginea unui punct luminos situat pe axa optică în afara distanţei focale nu va fi punctiformă, ci va apărea sub forma unei pete luminoase, mai mult sau mai puţin întinsă. Acest defect poate fi ameliorat prin diverse procedee.

a) Se combină o lentilă convergentă convexă puternică, constituită din sticlă cu indice de refracţie ridicat, cu o a doua lentilă divergentă (concavă), din sticlă cu indice de refracţie mic.

Aberaţia sferică a lentilelor cu indice mic este relativ mai mare. Aberaţia primei lentile (convergenţa şi indicele mare) poate fi deci, compensată de aberaţia de sens contrar a lentilei cu indice mic, chiar dacă puterea aceasta de divergenţă reduce numai parţial puterea de convergenţă a celei dintîi.

b) Un al doilea mijloc, prin care putem scade aberația sferică, constă în a reține razele periferice cu ajutorul unor ecrane inelare sau diafragme. Se renunță astfel parțial la luminozitatea imaginii, dar este preferabil să obținem o imagine mai puțin luminoasă și corectă, decît invers.

Sistemele de lentile cu aberația sferică corectată prin unul sau ambele procedee indicate se numesc aplanetice.

Un al doilea defect al lentilelor este ***aberația** cromatică*, datorită proprietății culorilor dinspre violet de a fi mai puternic refractate decît cele dinspre extremitatea roșie a spectrului; focarul razelor violete cade deci, mai aproape de lentilă, decît al razelor roșii. Între aceste două focare (roșu și violet) se situează focarele celorlalte culori. Fasciculele de lumină albă se descompun deci, trecînd prin lentilă. Rezultă că chiar dacă aberația sferică a fost corectată, din pricina aberației cromatice nu se obține reunirea razelor pornite dintr-un punct luminos alb într-alt punct alb, ci o suprafață întinsă, diferit colorată la centru și la margine.

Aberația cromatică se corectează alăturînd lentilelor convergente de crom (sticlă cu silicați de K și de Ca), lentilele divergente de flint (silicat de K și de Pb). Curburile lentilelor și calitatea sticlelor sînt astfel potrivite, încît lentila concavă divergentă, anulează în mare parte aberația cromatică a lentilei convexe, slăbind însă numai în mică măsură puterea ei de convergență. Asemenea sisteme de lentile se numesc *acromatice*. Variația indicelui de refracție de la sticlă la sticlă, fiind deosebită pentru fiecare culoare, chiar dacă s-a realizat un focar comun pentru două culori, celelalte culori nu se reunesc exact în același punct și persistă spectrul secundar al sistemelor acromatice. Suprapunînd trei lentile, una biconvexă de crom și două concav-convexe de flint, se poate obține un focar comun pentru trei culori, de exemplu pentru roșu, verde și violet. Deși mai persistă și aici spectre albe, spectrele terțiare, din punct de vedere practic, aberația cromatică este înlăturată.

Asemenea sisteme de lentile se numesc *apocromatice*. Tehnica modernă a dat la iveală compoziții noi de sticlă, cu ajutorul cărora se pot obține sisteme apocromatice chiar numai cu două lentile.

Formarea imaginii în microscop. Imaginea obiectelor așezate în afara planului focal al lentilelor convexe fiind reală, ea poate fi privită printr-o lupă, ca oricare alt obiect. Se realizează astfel microscopul compus; prima lentilă este obiectivul, a doua ocularul. Din cele de mai sus rezultă că obiectul trebuie așezat înaintea planului focal al obiectivului și că ambele lentile trebuie astfel fixate una față de cealaltă, încît imaginea reală și inversată, proiectată de obiectiv, să cadă înapoia planului focal, al lentilei oculare.

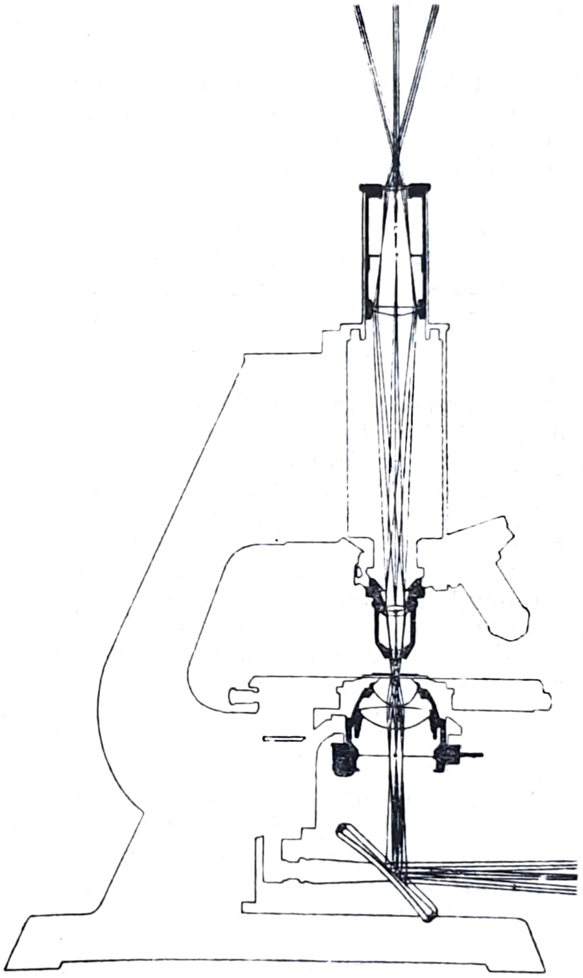


Fig. 213. — Schema formării imaginii în microscop.

Mărirea totală este produsul măririlor parțiale date de obiectiv și ocular. De pildă, cu un obiectiv 40 × și un ocular 10 × mărirea totală este de 400 de ori.

Tubul microscopului. Tubul microscopului îndeplinește două funcții: menține ocularul în poziția corectă față de obiectiv și împiedică pătrunderea laterală a luminii străine, în spațiul dintre ocular și obiectiv, ceea ce ar tulbura imaginea. Interiorul tubului este vopsit în negru mat, pentru anihilarea reflexelor. Lungimea totală a tubului (distanța ocular-obiectiv) este de 160 mm la majoritatea microscoapelor.

Tuburile drepte ale microscoapelor vechi au fost înlocuite, la microscoapele moderne, cu tuburi înclinate sau cu dispozitive binoculare, care permit examenul microscopic într-o poziție comodă, evitînd oboseala cercetătorului la observațiile îndelungate.

Obiectivele microscoapelor. Obiectivele microscoapelor sînt alcătuite din grupe de lentile fixate excentric într-o montură metalică. Prima sau primele grupe de lentile asigură puterea măritoare a obiectivelor ; restul grupelor de lentile, corecțiile aberațiilor sferice și cromatice.

Prima lentilă, singura accesibilă dinafară, se numește *lentila frontală*. Obiectivele slabe și medii se folosesc fără lichide de imersie și sînt denumite obiective uscate. Cele puternice se pot folosi numai cu un lichid intercalat între lentila frontală și lama port-obiect și se numesc obiective cu imersie. Prin folosirea unui lichid de imersie ca uleiul de cedru ($n = 1{,}51$), tot spațiul dintre lama port-obiect și lentila frontală a obiectivului devine omogen în ceea ce privește indicele de refracție. De aici denumirea de imersii omogene, date obiectivelor destinate să fie întrebuințate numai cu ulei de cedru. Puterea de mărire a fiecărui obiectiv este însemnată pe montura sa.

Obiectivele uscate și imersiile obișnuite sînt acromatice. Ele mai prezintă deci spectre secundare ; totuși, satisfac cerințele lucrărilor curente de laborator. Spectrul secundar al aberației cromatice este corectat abia la obiectivele apocromatice. Pe montura acestora este gravat cuvîntul „apocromatic” sau literele „apo”. Din motive tehnice, la obiectivele apocromatice nu se poate corecta variația cromatică a măririi (razele violete dau imagini mai mari decît cele roșii). Această imperfecțiune este înlăturată prin întrebuințarea concomitentă a ocularelor compensatoare, care prezintă același defect în sens invers. Există obiective semiapocromatice mai bine corectate decît cele obișnuite, prin întrebuințarea lentilelor de fluorină, care deși nu ating perfecția apocromatelor, totuși sînt foarte bune și au avantajul unei relative ieftinități. Și ele se întrebuințează numai în combinație cu oculare compensatoare. Obiectivele uscate puternice pot da imagini clare numai cu lamele de o anumită grosime (circa 0,17 mm), grosimea lamelelor intrînd în calculul corecției aberațiilor. Din această cauză, puterea de mărire a obiectivelor uscate curente nu depășește 40 ×, iar apertura 0,65, aceste valori fiind compatibile cu ușoarele variații ale grosimii curente a lamelelor. Obiectivele uscate mai puternice, sau cu apertură mai mare, sînt prevăzute cu sisteme speciale de corecție, permițînd o ajustare precisă, în funcție de grosimea lamelei.

Ocularele. Sînt de 3 tipuri : ocularele Huyghens, întrebuințate în mod curent și care sînt compuse din 2 lentile plan-convexe cu fețele plane în sus și separate de un ecran inelar, cu un diafragm care delimitează întinderea cîmpului în care imaginea este corectă. Ocularele compensatoare, astfel construite încît dau măriri mai mari pentru lumina roșie, decît pentru lumina violetă, în scopul de a compensa defectul pe care-l au obiectivele apocromatice sau semiapocromatice puternice. Drept semn distinctiv poartă gravate pe montura lor litera „K”, sau se scrie în întregime „ocular compensator”. Nu are rost să întrebuințăm ocularele compensatoare decît cu obiectivele care le necesită, adică apocromatele și semiapocromatele, sau obiectivele acromatice cu imersie. Obiectivele acromate pînă la o mărire de 40 × vor fi utilizate numai cu oculare H. Cel de-al treilea tip de oculare sînt cele folosite în microfotografie. Chiar cu obiectivele perfecte, cîmpul microscopic nu apare absolut plan. La examenul subiectiv acest defect nu este supărător întrucît, pe de o parte, observatorul poate fixa dintr-o dată, cu privirea, numai o mică parte a cîmpului microscopic, iar pe de altă parte, prin manevrarea vizei micrometrice, poate explora întregul cîmp.

Cînd este necesar să facem microfotografii, cîmpul trebuie să fie în întregime perfect plan. Aceasta se obține cu ocularele speciale, al căror nume variază după fabricație : oculare periplanmetrice, complanmetrice, homale, fotooculare etc.

Puterea de mărire proprie a ocularelor este însemnată pe fața superioară a monturii.

Importanța calității obiectivelor. Scopul măririi microscopice este de a ne informa asupra formei și structurii obiectului examinat, de a pune deci în evidență amănunte cît mai fine ale structurii sale. Asemenea detalii de formă și structură nu apar în imaginea definitivă microscopică, dacă nu sînt conținute și în imaginea reală dată de obiectiv. Calitățile unui microscop depind deci, în primul rînd, de calitatea obiectivelor sale.

Trei însușiri ale obiectivelor sînt de primă importanță pentru aprecierea calității lor: puterea de rezoluție, puterea de definire și luminozitatea.

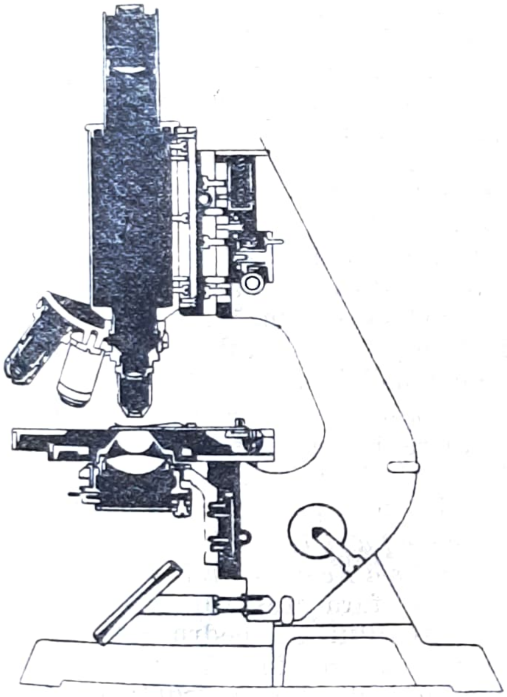


Fig. 214. — Secțiune longitudinală printr-un microscop monocular.

Puterea de rezoluție sau puterea separatoare este facultatea de a deosebi net două puncte sau două linii cît mai apropiate una de cealaltă. Puterea de rezoluție depinde de apertura numerică a obiectivului. Cercetările fundamentale ale lui Abbe au demonstrat că puterea de rezoluție și în general întreaga problemă a formării imaginii microscopice nu pot fi explicate decît pe baza teoriei ondulatorii a propagării luminii, adică de fenomenele de difracție și interferență.

Fără a intra în detalii de fizică teoretică, indicăm numai că apertura (deschiderea numerică) este definită de relația: $A = n \sin \alpha$, formulă în care n este indicele de refracție al mediului dintre lamă și obiectiv, iar α unghiul pe care îl face raza de oblicitate maximă care mai poate fi prinsă de obiectiv și axul optic al microscopului.

Din formula de mai sus și din figurile 216 și 217 reiese clar că apertura numerică nu poate fi mărită decît utilizînd lichide de imersie cu indice de refracție mai mare decît al aerului ($n = 1$) intercalate între lamă sau lamelă și lentila frontală a obiectivului.

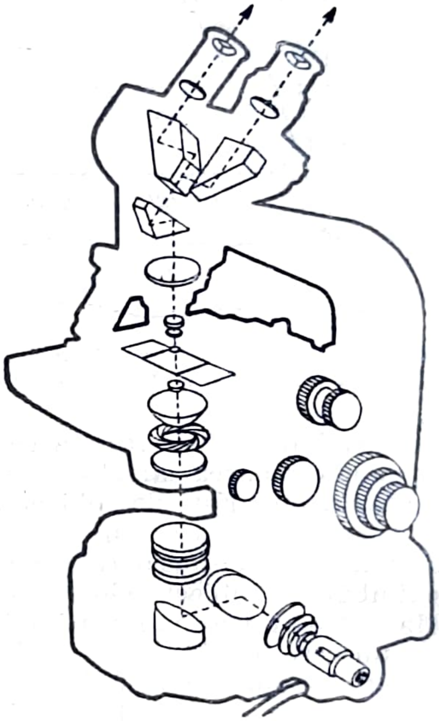


Fig. 215. — Schema formării imaginii într-un microscop modern binocular.

Lichidul de imersie nu poate fi intercalat între preparat și lentila frontală a oricărui obiectiv; obiectivele cu imersie sînt special calculate în acest scop.

Apertura maximă realizabilă la obiectivele uscate este de 0,95. Obiectivele uscate utilizate în practica curentă au o apertură maximă de 0,65 pînă la 0,85, în aceste limite variațiile de grosime ale lamelei fiind, practic, neglijabile.

Ca obiective uscate utilizate în mod curent cităm: 3 × (obiectiv lupă), 8 × ($A = 0{,}20$), 10 × ($A = 0{,}30$), 20 × ($A = 0{,}40$), 40 × ($A = 0{,}65$), 60 × ($A = 0{,}85$). Apertura maximă realizabilă la obiectivele cu imersie este în funcție de indicele de refracție al lichidului. Obiectivele cele mai utilizate în explorările biologice folosesc uleiul de cedru cu indicele de refracție de 1,51. Obiectivele cu imersie folosite în practica de laborator pot avea o apertură maximă de 1,40;

în general însă se utilizează obiective cu apertură de 1,25 pînă la 1,30.

Obiectivele cu imersie se notează cu inițialele majuscule HI (homogene immersion) sau IO (imersie omogenă). Lichidul de imersie are, practic, același indice de refracție ca și sticla folosită la confecționarea lamelor și lamelelor.

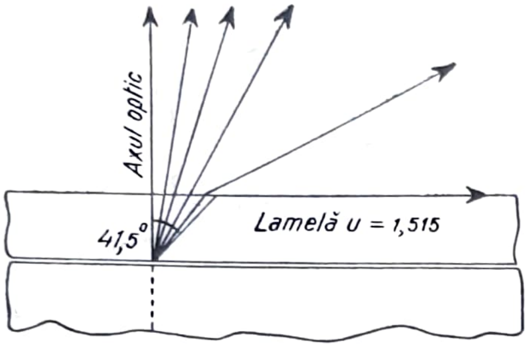


Fig. 216. — Obiectiv uscat. Între obiectiv și preparat se află aer, cu indicele de refracție n = 1.

Deși toate caracteristicile obiectivelor de imersie sînt gravate totdeauna pe montură, pentru diferențierea mai ușoară a acestora în cursul schimbărilor obiectivelor montate pe revolver, la extremitatea monturii obiectivului este gravat un cerc negru.

Ca exemple de obiective cu imersie curent folosite cităm: 90 × (A = 1,25) și 100 × (A = 1,30).

În ceea ce privește mărirea utilă, care poate fi realizată prin combinarea diverselor obiective și oculare, aceasta este condiționată, pe de o parte, de apertura obiectivului, iar pe de altă parte, de lungimea de undă a luminii.

Considerînd lungimea de undă pentru care ochiul are cea mai mare sensibilitate (galben-verde), puterea de mărire utilă a unui obiectiv este cuprinsă între 50 pînă la 100 de ori apertura numerică. Așadar, nu are rost încercarea de a realiza măriri enorme prin combinarea unui obiectiv de imersie cu oculare cît mai puternice. Mărirea dată de ocular trebuie să fie suficientă pentru a permite vederea amănuntelor oferite de obiectiv. Este totuși comod să realizăm o mărire totală care să întreacă strictul necesar, pentru a nu fi siliți să utilizăm toată acuitatea noastră vizuală în timpul examenului microscopic, ceea ce ar fi obositor. Măririle oculare excesive trebuie evitate, căci ele dau imagini neclare. Dacă însă mărirea dată de ocular este prea slabă, rămîn neobservate amănunte care există în imaginea microscopului și astfel posibilitățile obiectivului sînt incomplet folosite. Așadar, mărirea dată de ocular nu trebuie să fie nici excesivă, dar nici prea slabă. După cum am arătat, în practica curentă, pentru a avea imagini optime, mărirea totală trebuie să se mențină la 500—1 000 de ori apertura; aceasta este puterea de mărire utilă. Spre pildă, la întrebuințarea imersiei 90 × cu A = 1,25 mărirea totală nu trebuie să întreacă 1250 ×. Dacă dorim măriri mai puternice, trebuie să luăm altă imersie, cu apertura mai mare. Pe de altă parte, cu imersia menționată (A = 1,25), dacă mărirea totală este sub 600, nu mai vedem tot ce s-ar putea vedea ca detaliu cu acest obiectiv.

Puterea de definire a unui obiectiv este proprietatea de a da imagini cu conturul net și de formă corespunzătoare cu realitatea. Ea este în funcție de modul cum au fost corectate defectele lentilelor.

Luminozitatea este raportul care rezultă dintre intensitatea luminoasă a obiectivului și cea a imaginii. Ea depinde, în cea mai mare parte, de apertura obiectivului.

Influența lichidelor de imersie asupra traiectului razelor luminoase. În afara creșterii puterii de rezoluție, folosirea uleiului de cedru este avantajoasă, prin faptul că transformă întreg spațiul dintre lama port-obiect și lentila frontală a obiectivului într-un spațiu omogen din punctul de vedere al indicelui de refracție. Consecința este că multe raze care fară lichid de imersie ar fi pierdute prin refracție și reflexie totală, în prezența acestuia ajung în obiectiv și participă la formarea imaginii. Într-adevăr, la trecerea

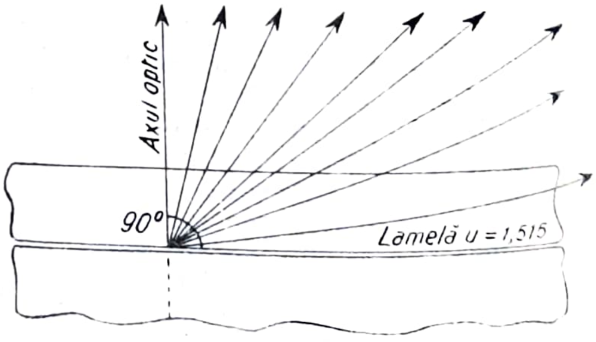


Fig. 217. — Obiectiv cu imersie. Între obiectiv și preparat se află ulei de cedru cu indice de refracție n = 1,515.

din medii cu indice de refracţie mare, ca sticla, în medii cu indice de refracţie mic, ca aerul, razele se îndepărtează de normală ; deci unghiul de incidenţă este mai mic decît unghiul de refracţie. O mică parte din lumină se reflectă în interiorul sticlei. Aceste constatări reies din fig. 216 şi 217.

Iluminarea oblică. Un procedeu mai practic şi des întrebuinţat pentru a creşte puterea de rezoluţie constă în utilizarea luminii oblice. Aceasta se realizează în două moduri : primul constă în a îngusta şi a deplasa diafragmul în afara axului optic. Multe microscoape au, în acest scop, un cărucior cu viză graţie căruia irisul condensatorului poate fi deplasat excentric.

Provocăm astfel pătrunderea în cîmpul obiectivului a unui spectru de difracţie, care în lumina dreaptă cădea în afara lui. Devin vizibile detalii anterior invizibile. Maximum ce se poate obţine prin acest procedeu este dublarea puterii de rezoluţie, anume atunci cînd înclinarea razelor care iluminează obiectul este egală cu înclinarea razelor care limitează apertura obiectivului. Bineînţeles că prin înclinarea luminii creşte puterea de rezoluţie numai pentru structurile orientate perpendicular pe direcţia de deplasare a irisului. Dar acesta fiind rotabil în jurul axului optic, putem proiecta razele oblice rînd pe rînd în diferite direcţii, examinînd în mod succesiv structurile orientate în diverse sensuri.

Se înţelege că procedeul dezaxării diafragmului este aplicabil numai cu orificiul irisului îngustat şi se practică numai cînd sîntem siliţi să lucrăm cu diafragmul îngustat (obiectivele slabe). Microbiologii îl utilizează cînd examinează coloniile microbiene de pe suprafaţa mediilor solide, cu obiective uscate. În acest caz, oblicitatea luminii mai are şi avantajul de a provoca umbre favorabile observaţiei neregularităţilor de pe suprafaţa obiectului, care dau aspecte de relief.

Al doilea mod prin care se realizează, în mod curent, iluminarea oblică este folosirea condensatoarelor. Razele oblice fiind proiectate asupra obiectului, de jur împrejur, din toate direcţiile, va fi crescută puterea de rezoluţie concomitent pentru toate structurile obiectului, oricare ar fi orientarea lor în spaţiu. Condensatoarele proiectează asupra obiectului nenumărate fascicule luminoase, de înclinaţie diferită. Se nasc deci nenumărate imagini, cu diverse puteri de rezoluţie. Toate aceste imagini dau naştere, prin suprapunerea lor, la imagini totale, pe care le privim prin ocular. Pentru observaţia celor mai fine detalii este determinant unghiul razelor celor mai înclinate date de condensator.

Lichidele de înlocuire pentru uleiul de cedru. Din motivele arătate mai sus, defectele lentilelor obiectivelor sînt corectate cu o grijă deosebită. Defectele reapar în mod supărător dacă învecinăm lentilele cu un mediu cu alt indice de refracţie. Din acest motiv, obiectivele microscopice nu pot fi întrebuinţate decît în mediul căruia i-au fost destinate : obiectivele uscate în aer, imersiile numai cu lichid de imersie. Lichidul de imersie va trebui să aibă indicele de refracţie prevăzut ; se va vedea prost sau de loc cu alt indice. De aici dificultăţile întîmpinate cînd încercăm să înlocuim uleiul de cedru cu alte lichide de imersie. Asemenea încercări se pot face cu următoarele lichide :

a) *Anisolul, o aldehidă anizică* (n = 1,52), cu indice de refracţie apropiat de al sticlei şi al uleiului de cedru. Are avantajul că dă imagini bune, nu decolorează preparatele, se evaporă lent şi nu lasă reziduuri. Faţă de uleiul de cedru are dezavantajul că este volatil şi mai fluid.

b) *Uleiul de parafină* (n = 1,47) dă imagini proaste. Poate fi ameliorat amestecînd la 7 părţi ulei, 24 părţi bromonaftalină.

c) *Uleiul de ricină* (n = 1,48). Dă imagini ceva mai bune decît precedentul. Se poate folosi cu rezultate bune un amestec conţinînd 7—8 părţi ulei de ricină şi 2—3 părţi benzoat de benzil. După amestecare se agită 10 minute, se lasă 6 ore la 37°, se mai agită timp de 5 minute, şi se păstrează la temperatura camerei. Uleiul trebuie să fie de la început perfect limpede.

d) *Glicerina pură* de 30°, amestecată cu un volum egal de apă distilată.

Lichidele de imersie trebuie să aibă, în afara unui indice de refracţie potrivit, încă o serie de alte însuşiri ; nu trebuie să fie volatile, nu trebuie să decoloreze preparatele colorate ; dacă sînt în oarecare măsură volatile trebuie să se evapore fără reziduu, nu trebuie să atace partea metalică a obiectivelor, nu trebuie să dizolve montura lentilelor etc. Lentila frontală a obiectivelor este fixată de montură numai în anumite puncte. Între aceste puncte există, între lentilă şi piesa metalică, un spaţiu capilar în care pătrunde lichidul de imersie, dacă nu este suficient de vîscos. Se va forma astfel, pe faţa posterioară a lentilei, o pătură subţire de lichid, care se va usca şi va face imersia inutilizabilă. Lichidul de imersie trebuie deci să nu fie prea fluid.

Dispozitivul de iluminare a microscopului. Rolul acestui dispozitiv este de a proiecta asupra obiectului lumina necesară examenului microscopic. Dispozitivul de iluminare complet cuprinde: izvorul de lumină, oglinda microscopului, condensatorul, diafragmul de apertură care însoţeşte condensatorul şi diafragma care însoţeşte sursa de lumină. În cazul lămpilor de microscopie perfecţionate, izvorul de lumină este punctiform (bec cu voltaj redus). Imaginea filamentului este proiectată la nivelul diafragmei de apertură de o lentilă colectoare, în faţa căreia este montat diafragmul de cîmp, care este proiectat de condensator în planul cîmpului microscopic. Oricît de perfecţionat ar fi un microscop, serviciile pe care le aduce sînt incomplete dacă dispozitivul de iluminare nu este bun şi corect folosit.

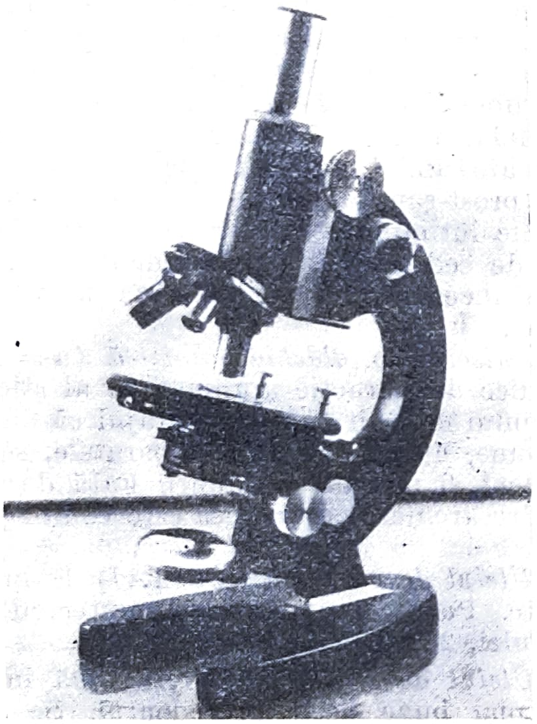


Fig. 218. — Microscop monocular romînesc realizat în 1956 de Industria optică romînă (I.O.R.).

Obiectele de observaţie microscopică în ştiinţele biologice sînt în general transparente, frotiuri subţiri, secţiuni prin ţesuturi, lichide între lamă şi lamelă, în picătură suspendată etc. Tehnica iluminării este adaptată acestei necesităţi. Lumina, îndrumată spre obiect de oglinda situată sub platina microscopului, străbate obiectul transparent, suferă difracţia produsă de structurile sale şi ajunge apoi în sistemul optic al microscopului.

Condensatorul are rolul de a concentra asupra obiectului un con luminos larg, adică conţinînd raze cît mai oblice. El este fixat sub platina microscopului printr-un manşon metalic din care poate fi scos cu uşurinţă. Montura sa conţine 2 sau 3 lentile convergente, care concentrează lumina provenită de la sursa luminoasă. Dacă unghiul de deschidere al conului luminos proiectat de condensator este inferior unghiului de apertură al obiectivului, posibilităţile acestuia sînt incomplet utilizate. Dacă, din contra, apertura conului luminos întrece pe cea a obiectivului, sînt proiectate asupra preparaţiei raze inutile, care luminează cîmpul, provocînd reflexe supărătoare, fără a contribui la formarea imaginii; aceasta este înecată într-un flux luminos prea abundent. Imaginea cea mai bună se obţine cînd apertura numerică a conului de iluminare corespunde cu aceea a obiectivului. În această privinţă sînt de considerat două eventualităţi; prima, cînd lucrăm cu obiective slabe, apertura numerică mică, condensatoarele dînd un con luminos larg, va trebui să reducem excesul de lumină scăzînd apertura unghiului de iluminare cu ajutorul diafragmului în iris, situată sub condensator. Îngustînd acest iris, vom constata că se accentuează contrastele şi că devin vizibile amănunte invizibile mai înainte. Dar dacă închidem irisul dincolo de o anumită limită, puterea de rezoluţie, ca şi luminozitatea cîmpului, scad prea mult. Deschizătura optimă se caută prin tatonare, cu ochiul la microscop; ea este aceea care realizează compromisul cel mai prielnic între factorii citaţi (contrast-puterea de rezoluţie-intensitatea luminoasă a cîmpului). Putem preveni lipsa de precizie care ar putea surveni prin manevrarea irisului, scoţînd ocularul şi privind prin tubul microscopului; vedem atunci imaginea sursei de lumină încadrată de marginea circulară a obiectivului. Irisul trebuie îngustat cel puţin pînă cînd începem să vedem marginile diafragmei la limita obiectivului. În general, aspectul global cel mai favorabil se obţine prin reducerea deschizăturii diafragmei cu 1/3 din acea a obiectivului; în aceste condiţii contrastele sînt maxime, iar puterea de rezoluţie şi intensitatea luminoasă a imaginii sînt de bună calitate. Contrastele pot fi mărite și prin coborîrea condensatorului și în acest fel, micșorăm unghiul de deschidere al razelor proiectate asupra obiectului. Totuși, acest procedeu este îngăduit numai în oarecare limite. Deschiderea conului de iluminare se va regla deci cu ajutorul irisului și numai în oarecare măsură prin coborîrea condensatorului. Regula că apertura conului de iluminare trebuie să corespundă cu a obiectului rămîne bineînțeles valabilă și atunci cînd lucrăm cu obiective puternice (apertură numerică mare). Diafragmul de apertură va fi deci, complet deschis și condensatorul urcat pînă cînd imaginea diafragmului de cîmp al lămpii apare clar în cîmpul microscopului; poziția depinde de grosimea lamei. Condensatoarele obișnuite, cu 2 lentile, au o apertură numerică maximă de 1,2. Cînd lucrăm cu imersii cu A peste 1,2 trebuie să folosim condensatoarele cu 3 lentile, care au o apertură numerică maximă = 1,4. Dar atît timp cît există aer între condensator și lama port-obiect, apertura numerică a conului de iluminare nu poate întrece 1,0, razele foarte oblice, cu incidență de peste 42°, neputînd ieși din sticlă. Pentru a utiliza în întregime puterea de rezoluție a obiectivelor cu apertură numerică mare, imersiile, este deci indispensabil să introducem ulei de cedru în spațiul dintre lentila frontală a condensatorului și lamă. Condensatoarele nefiind sisteme optice atît de exact corectate ca obiectivele, este îngăduită o variabilitate mai mare a indicelui de refracție al lichidului de imersie.

În lucrările obișnuite de bacteriologie, dacă nu folosim lichide de imersie între condensator și lamă, realizăm în mod automat o apertură a conului de luminare de 2/3 din apertura obiectivelor cu imersie. Problemele curente de examen microscopic sînt deci rezolvate fără lichid de imersie între condensator și lamă. Dar lucrul fără lichid de imersie la condensator nu trebuie să devină un obicei și să lăsăm neîntrebuințată posibilitatea menționată, atunci cînd obiectul de cercetat este la limita vizibilității microscopice, cum este cazul cu ricketsiile, leptospirele, treponemele etc. Neglijînd această posibilitate, pierdem aproximativ jumătate din puterea de rezoluție a obiectivelor.

Oglinda microscopului, situată sub condensator, este deplasabilă în toate sensurile, pentru a se putea proiecta cu ușurință lumina în orice direcție dorită. Condensatoarele sînt construite pentru a fi folosite cu oglinda plană. Folosim deci oglinda plană ori de cîte ori lucrăm la lumina zilei sau cu o lampă de microscop corect construită, deci aproape totdeauna. Oglinda concavă este folosită în două împrejurări: cînd lucrăm fără condensator și dorim totuși să concentrăm lumina asupra obiectului mai mult decît cu oglinda plană, sau cînd lucrăm cu condensator, dar cu un bec electric, fără lentilă convergentă în fața sa. În acest ultim caz, oglinda concavă conferă razelor luminoase o poziție care se apropie mai mult sau mai puțin de aceea pe care ar trebui s-o aibă, așa încît imaginile lor vor fi ceva mai bune decît cu oglinda plană.

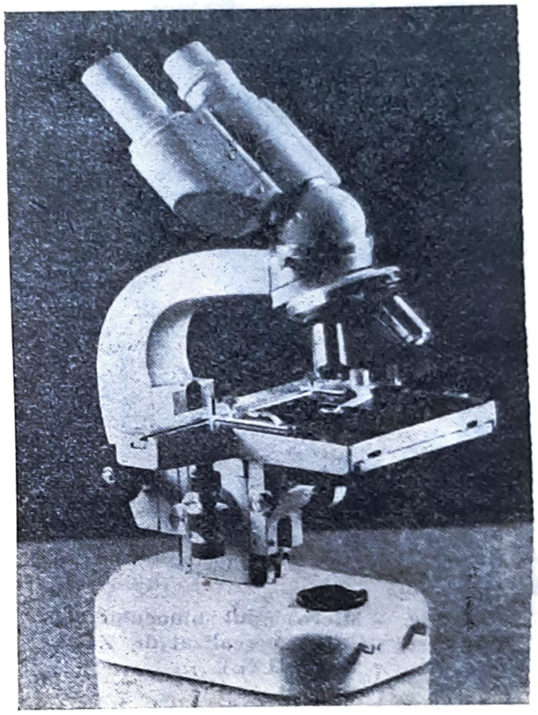


Fig. 219. — Microscopul binocular romînesc, realizat în 1959 de Industria optică romînă (I.O.R.).

Izvoarele de lumină. Lumina difuză a zilei este favorabilă prin uniformitatea cu care luminează tot cîmpul, ceea ce corespunde cu prevederile construcției condensatoarelor.

Condițiile de lucru la lumina zilei sînt următoarele:

a) oglinda microscopului să nu primească lumina solară directă, prea intensă și orbitoare (în afară de cazul examenului în cîmp întunecat);

b) rama ferestrelor să nu se proiecteze pe oglinda microscopului, pentru că determină o iluminare inegală;

c) lumina zilei să nu bată în ochii observatorului;

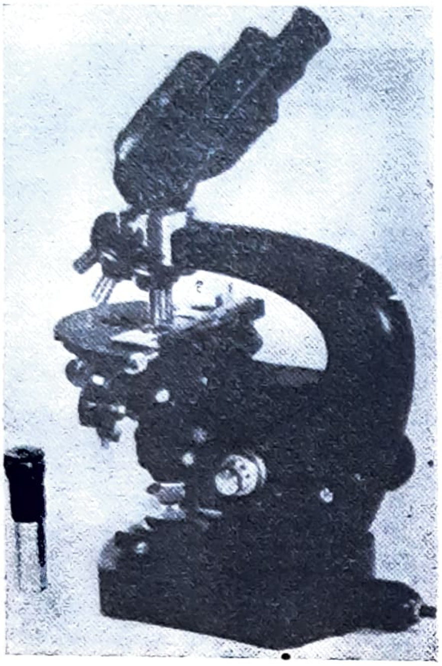


Fig. 220. — Microscopul binocular de cercetare ştiinţifică realizat de Zeiss (R.D.G.).

d) să nu provoace reflexe supărătoare pe faţa superioară a lentilei oculare;

e) microscopul să nu fie aşezat pe o masă albă, astfel situată în faţa ferestrei încît strălucirea ei să egaleze sau chiar să întreacă pe aceea a cîmpului microscopului.

Lumina zilei fiind inconstantă, se preferă în general lucrul la lumina artificială. Masa microscopului se aşază astfel încît să nu fie cu faţa spre fereastră şi cel mai bine este să întoarcem chiar spatele ferestrei.

Lumina cea mai favorabilă o dau lămpile speciale de microscop, prevăzute cu lentile colectoare şi cu diafragmă în iris. Diafragmul iris ne permite să îngustăm diametrul cîmpului luminat. Îngustarea nu trebuie să scadă intensitatea luminoasă. De aici şi denumirea de „diafragm de cîmp'', în opoziţie cu „diafragmul de apertură'', situat sub condensator. Diafragmul de cîmp serveşte la limitarea suprafeţei luminate la strictul necesar, evitîndu-se astfel lumina secundară care, prin reflexe, ar putea voala detaliile obiectului. S-a văzut mai sus că acest rol de reţinere a luminii inutile poate fi preluat şi de diafragmul de apertură, aşa încît diafragmul de cîmp pare a fi inutil. Aceasta nu este însă exact, pentru că cele mai bune rezultate le obţinem cînd putem influenţa diverşi factori, care impun o iluminare bună independent unul de celălalt. Diafragmul de cîmp potriveşte diametrul fasciculului luminos proiectat asupra preparaţiei şi diafragmul de apertură creează contrastele favorabile. Cînd o îngustăm pe aceasta din urmă, scade în acelaşi timp şi luminozitatea cîmpului; totuşi, pentru ca acest diafragm să fie absolut liber pentru ajustarea aperturii, el nu ar trebui folosit pentru scăderea intensităţii luminoase, ci aceasta ar trebui obţinută exclusiv cu ajutorul unui reostat, care permite reglementarea curentului din lampă.

În practică sîntem deseori în situaţia de a avea surse de lumină mai puţin perfecte decît lămpile speciale; de exemplu, un simplu bec electric al unei lămpi de birou. Becul trebuie să fie mat. În caz contrar, este indispensabil să interpunem în traiectul razelor un filtru mat, care să uniformizeze lumina. În acest scop se găseşte sub condensator un inel port-filtru amovibil, care poate primi rondele de sticlă. În lipsa rondelelor de sticlă mată putem uniformiza lumina introducînd în faţa becului 1—2 straturi de tifon sau de foiţă subţire, sau putem fixa, într-un mod oarecare, o rondelă de foiţă pe inelul de sub condensator. Situaţia poate fi ameliorată prin folosirea oglinzii concave sau, mai bine, aşezînd în faţa becului un balon mare plin cu apă. Acesta joacă rol de lentilă şi concentrează lumina asupra oglinzii.

Pentru a controla luminarea oglinzii aplicăm pe ea o bucată de hîrtie, pe care pata luminoasă este mai bine vizibilă decît pe suprafaţa sticlei. Lumina trebuie să cadă în centrul ei şi, privind prin tubul microscopului, după scoaterea ocularului, se poate vedea bine dacă cîmpul microscopic este sau nu luminat uniform şi simetric. Lumina artificială conţine proporţional mai mult roşu decît lumina zilei. De aceea rondelele de sticlă mată se fabrică deseori din sticlă albăstruie, astfel culoarea luminii devine asemănătoare cu a luminii zilei. În acelaşi scop se poate adăuga în balonul de apă din faţa becului o soluţie amoniacală de sulfat de cupru (0,5 g $CuSO_4$ la 1 litru H_2O distilată + 10 ml NH_3 25%). Cînd soluţia se înverzeşte, după o păstrare mai îndelungată, adăugăm din nou puţină apă amoniacală.

Microscopiştii care dispun de aparatură modernă sînt scutiţi de a se preocupa de problema luminării, mulţumită faptului că există aparate de luminat care conţin toate elementele necesare, fixate sub condensator, sub denumirea de luminator pancratic.

Examenul pe cîmp întunecat. Cîmpul întunecat se realizează obturînd partea centrală a unui condensator cu apertură mare, printr-un ecran discoidal, cu diametrul suficient de mare pentru ca unghiul de deschidere a conului de umbră format să fie cel puţin egal cu al obiectivului întrebuinţat. Din cauza oblicităţii lor, majoritatea razelor luminoase nu ajung deci în obiectiv şi cîmpul microscopic apare întunecat. Dacă aşezăm însă, în locul de încrucişare a razelor un obiect oarecare, contururile acestuia, puternic luminate de razele pe care le primeşte de jur împrejur, vor difracta razele de lumină, obiectul apărînd strălucitor pe fondul întunecat al cîmpului microscopic. În cazul obiectivelor cu imersie, experienţa nu reuşeşte decît dacă interpunem ulei de cedru între frontala condensatorului şi lama portobiect; în absenţa acestuia, razele luminoase nici nu ar putea ieşi din condensator. Această modalitate de examinare se numeşte examenul pe cîmp sau fond întunecat şi este des întrebuinţată pentru evidenţierea microorganismelor greu vizibile prin metodele obişnuite, fie că sînt greu colorabile, fie că sînt foarte mici, ca treponemele, leptospirele, rickettsiile etc. Unele microscoape sînt înzestrate cu asemenea discuri metalice, care se aplică pe faţa inferioară a condensatorului. Dar cele mai bune rezultate se obţin cu condensatoarele paraboloide şi cele cardioide, anume construite în acest scop. Condensatoarele paraboloide sînt construite dintr-un corp de sticlă cu suprafaţa reflectantă în formă de parabolă trunchiată. Focarul se află deasupra porţiunii trunchiate. Partea centrală a condensatorului este obturată. Condensatoarele cardioide dau imagini şi mai strălucitoare decît precedentele, reunirea razelor într-o suprafaţă aproape punctiformă fiind şi mai perfectă. Ecranul permite trecerea unui inel luminos îngust, cuprins între apertura 1,1 şi 1,4. Razele sînt reflectate de două ori pe suprafeţele sferice şi se reunesc într-un singur punct. De aceea, denumirea de „condensator cu dublă reflexie" este deseori folosită pentru acest tip de condensator.

Executarea examenului pe cîmp întunecat. Fixăm un condensator paraboloid sau cardioid în manşonul de metal, înlocuind condensatorul obişnuit. Se coboară puţin condensatorul, apoi se pune o picătură de ulei de cedru pe lentila superioară a condensatorului. Se aşază lama cu preparatul proaspăt, de pildă o picătură de exsudat din şancrul sifilitic sau o picătură dintr-o cultură de leptospire, între lamă şi lamelă şi se ridică condensatorul încet, pînă cînd picătura de ulei de cedru vine în contact cu faţa inferioară a lamei cu preparatul de examinat. Pentru a evita formarea bulelor de aer este recomandabil să aşezăm o picătură de ulei de cedru şi pe faţa inferioară a lamei cu preparatul de examinat şi, în acest fel, prin ridicarea condensatorului, contopim cele 2 picături de ulei de cedru.

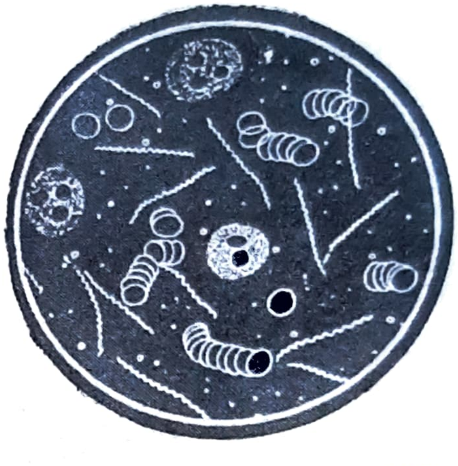


Fig. 221. — Serozitate de şancru sifilitic. Examenul pe cîmp întunecat (× 400).

Se pune la punct imaginea, la început cu un obiectiv slab 3× sau 20×. Dacă oglinda este bine orientată, trebuie să se vadă în centrul cîmpului o pată luminoasă. Această pată, care corespunde imaginii sursei de lumină, trebuie să fie adusă, cu ajutorul mişcărilor oglinzii, în centrul cîmpului, iar prin uşoare mişcări de verticalitate ale condensatorului trebuie micşorată la maximum. Dacă preparatul nu se găseşte în planul orizontal, ci mai jos sau mai sus, pata luminoasă ia o formă inelară.

Atunci cînd imaginea sursei de lumină este centrată şi pusă la punct corect, se pune o picătură de ulei de cedru pe lamelă şi se examinează cu obiectivul de imersie. În cîmpul microscopic apar leucocite, hematii şi treponeme sau leptospire mobile, toate luminate în alb strălucitor, pe fondul întunecat, de culoare neagră.

Atragem în mod deosebit atenția asupra faptului că toate condensatoarele speciale pentru cîmp întunecat au un focar foarte scurt, de maximum 1,1 mm, astfel încît ele nu pot fi utilizate decît dacă lamele de sticlă sînt foarte subțiri, grosimea maximă a lamei să nu depășească 0,8 — 1 mm.

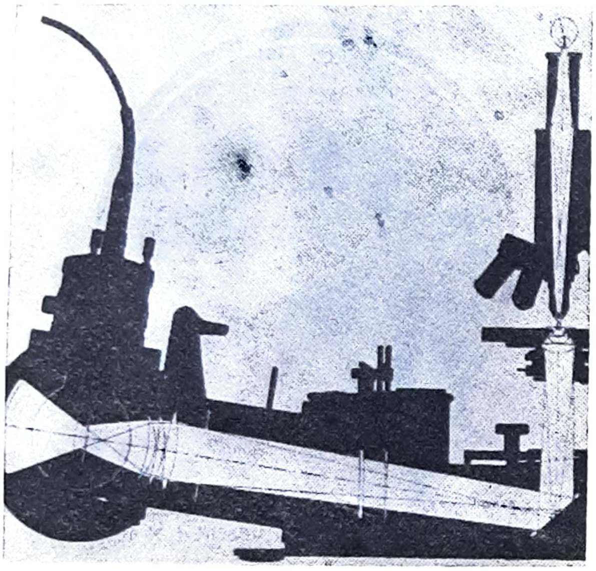


Fig. 222. — Schema dispozitivului de iluminare cu raze ultraviolete pentru microscopie cu fluorescență (adaptare după Reichert).

În ceea ce privește obiectivele care pot fi utilizate pentru examenul pe cîmp întunecat, recomandăm următoarele : toate obiectivele uscate pînă la apertura de 0,85, iar în ceea ce privește imersiile, numai obiectivele speciale 90 × cu diafragmul iris și 60 × (A = 0,1) cu diafragmul iris.

Diafragmul iris al obiectivului cu imersie este absolut necesar pentru obținerea cîmpului întunecat, întrucît apertura normală a acestor obiective depășește apertura conului de lumină al condensatorilor speciali de cîmp întunecat.

Microscopul cu fluorescență

Acest tip de microscop, care ca sursă de lumină folosește lumina ultravioletă (sau, în anumite cazuri, albastrul și violetul extrem din spectrul vizibil), este utilizat în practica medicală pentru decelarea bacililor tuberculoși, sau leproși în produsele patologice. Avantajul acestei metode microscopice constă în faptul că examenul se poate face cu un obiectiv uscat și deci un cîmp întunecat cuprinde o suprafață de preparat mult mai mare. De asemenea, bacilii izolați pot fi descoperiți cu mai multă ușurință decît cu obiectivul de imersie. Examenul microscopic se efectuează astfel mai rapid și cu mai multă exactitate. Principiul metodei este următorul: bacilii tuberculoși, colorați cu o substanță fluorescentă (auramină, primulină, fluoresceină), nu pierd această colorație în urma acțiunii acizilor, iar examinați pe un fond întunecat, în lumina ultravioletă, apar fluorescenți, cu o luminozitate verzuie. Colorația frotiului de spută se face ca și după metoda Ziehl-Neelsen, cu deosebirea că auramina înlocuiește fucsina și nu se mai recolorează cu albastru de metilen. Sursa de lumină este o lampă electrică cu vapori de mercur, în al cărei spectru predomină ultravioletele. Razele suplimentare din spectrul luminii vizibile sînt absorbite de un filtru special, care lasă să treacă numai razele ultraviolete.

Preparatul se examinează de obicei cu un obiectiv uscat; se poate însă folosi și imersia; în acest caz, în locul uleiului de cedru, care este fluorescent, se întrebuințează glicerina. Sursa de lumină trebuind să fie de obicei foarte puternică, pentru a elimina razele calorice, acestea se absorb cu ajutorul unei soluții de sulfat de cupru 5—10%, pusă într-o cuvă specială, intercalată între lampă și oglinda microscopului.

La orice microscop obișnuit se poate adapta dispozitivul pentru microscopie cu fluorescență. Aplicațiile microscopiei cu fluorescență sînt numeroase în cercetarea științifică. În ultimii ani, cercetarea anticorpilor fluorescenți a deschis noi perspective în imunologie; în practica diagnosticului de laborator are încă o folosință limitată.

Microscopul cu contrast de fază

În biologie cele mai multe obiecte microscopice sînt atît de uniform transparente, încît structurile lor rămîn invizibile cu microscopul obișnuit, dacă nu le colorăm. Microscopul cu contrast de fază permite studiul lor fără nici un artificiu de colorare. Întrucît fixarea prealabilă a preparatului, deci omorîrea celulelor, nu mai este necesară, se pot urmări direct, sub obiectivul microscopului, procese vitale în desfășurare, pe care altădată trebuia să le întrezărim fragmentar pe preparații fixate și colorate. În anumite cazuri interpretarea imaginii trebuie făcută însă cu mult discernămînt, intrucît, procedeul prin care se obține contrastul intervenind în focarul posterior al obiectivului în locul unde se formează imaginile de difracție, se pot produce imagini false. În general aceste falsuri se limitează la apariția unui halou în jurul obiectelor și la așa-numitul fenomen de inversiune : pete clare în interiorul unor obiecte care ar trebui să fie uniform întunecate.

Ținînd seama însă că artefactele de structură care apar în urma fixării și colorării sînt mai grosolane și dăunează observației corecte, importanța unui asemenea mijloc de investigație este evidentă.

Cu microscopul obișnuit structurile vizibile sînt perceptibile grație faptului că rețin atîta lumină, încît iau naștere scăderi de intensitate luminoasă (contraste) suficiente pentru a fi percepute. Aceste scăderi de intensitate se datoresc, de fapt, scăderii de amplitudine a vibrațiilor. Preparațiile microscopice care dau asemenea imagini se numesc „preparații de amplitudine”. Acesta este cazul preparatelor microscopice transparente, dar colorate.

Preparațiile de amplitudine dau naștere, mai întîi în planul focal, apoi în planul imaginii, unor serii de maxime și minime luminoase, deci unor variații de intensitate luminoasă, a căror distribuție în spațiu corespunde distribuției structurilor obiectului. În cazul preparatelor microscopice transparente și incolore, viteza de propagare a vibrațiilor luminoase este încetinită în mediile mai dense cu indice de refracție mai mare, sau în porțiunile mai groase, în raport cu porțiunile învecinate mai subțiri ale obiectului, amplitudinea ondulațiilor rămînînd însă constantă. Se nasc astfel, în planul focal și în planul imaginii, diferențe de fază, a căror distribuție în spațiu corespunde distribuției structurilor obiectului. Preparațiile microscopice care întîrzie astfel, în anumite locuri, mersul luminii, fără a provoca scăderi de intensitate luminoasă, se numesc „preparații de fază”. Atît ochiul, cît și placa fotografică sînt insensibile față de diferențe de fază, percep numai diferențe de intensitate; de aceea preparatele de fază nu dau imagini vizibile.

Întrebarea care se pune este dacă variațiile de fază survenite în mersul razelor nu pot fi transformate în variații de intensitate luminoasă. În caz afirmativ, imaginea invizibilă a preparației de fază ar deveni vizibilă. Problema a fost rezolvată în 1932, de fizicianul olandez F. Zernicke.

Fără a intra în detaliile teoriei, care este extrem de complicată, explicația simplificată la maximum a fenomenelor care se petrec cu prilejul transformării imaginilor de fază invizibile, în imaginii de amplitudine vizibile, este următoarea :

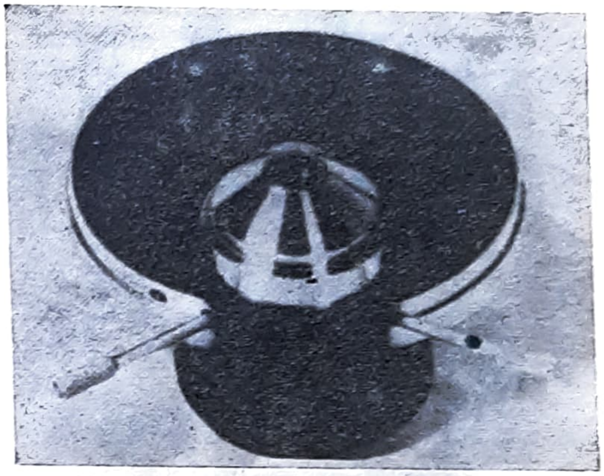


Fig. 223. — **Condensator special Zeiss cu revolver pentru diafragmele inelare necesare microscopiei cu contrast de fază.**

Vibrațiile care provin de la detaliile preparatului, mai refringente sau mai groase, care sînt întîrziate în raport cu vibrațiile care provin din porțiunile înconjurătoare și care constituie lumina directă sînt, pe de o parte, descompuse vectorial în vibrații de aceeași fază și amplitudine cu aceea a luminii directe, iar pe de altă parte, în vibrații care reprezintă lumina difractată și care sînt întîrziate cu 1/4 din lungimea de undă. Pentru a putea acționa este necesar să se separe, în focarul posterior al obiectivului, locul prin care trece lumina directă, de locul prin care trece lumina difractată. Aceasta se realizează limitînd, în dreptul diafragmului de apertură al condensatorului și deci și în focarul posterior al obiectivului, secțiunea fasciculului de luminare, la un cerc cît mai îngust. Dacă acoperim acum restul suprafeței lentilei obiectivului, care se află în focarul posterior, cu un strat transparent dintr-o anumită substanță, de alt indice de refracție decît al sticlei, care are menirea să întîrzie razele difractate cu încă 1/4 din lungimea de undă, deci în total cu 1/2, vom aduce direcția vectorilor reprezentînd aceste raze în opoziție cu direcția vectorilor reprezentînd razele directe.

Prin interferență, în planul imaginii, amplitudinea razelor directe va fi micșorată în dreptul detaliilor mai refringente sau mai groase, care vor apărea mai întunecate decît mediul înconjurător, devenind astfel vizibile. Pentru a mări contrastul, întrucît amplitudinea razelor difractate este mică, se operează, de asemenea, o reducere a amplitudinii razelor directe, în dreptul cercului prin care trec acestea din urmă depunînd pe acest cerc un strat metalic absorbant.

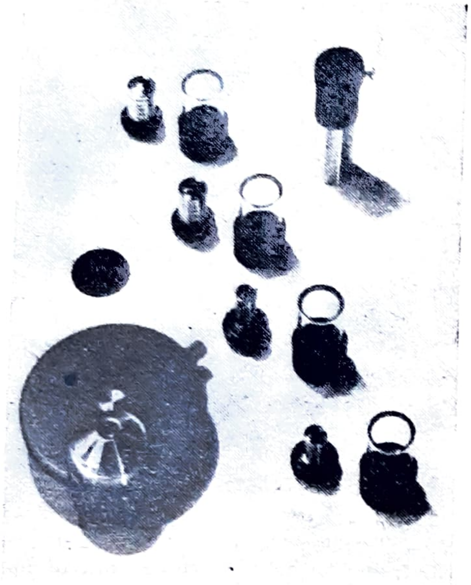


Fig. 224. — Obiectivele, condensatorul şi luneta specială pentru realizarea dispozitivului de microscopie prin contrast de fază.

În aceste condiţii, imaginea de fază este transformată într-o imagine de amplitudine cu contraste viguroase, detaliile obiectelor studiate devenind perfect vizibile, putînd fi, de asemenea, înregistrate clar pe placa fotografică.

Punerea în funcţiune a microscopului cu contrast de fază comportă următorii timpi:

a) obiectivele obişnuite ale microscopului fotonic se înlocuiesc cu obiectivele de contrast de fază. Acestea au marcate pe montura lor literele F sau PH (phase). Dacă privim prin ele, se vede plăcuţa-inel Zernicke;

b) condensatorul obişnuit se înlocuieşte cu condensatorul cu revolver, destinat examenului cu contrast de fază. Revolverul se învîrteşte pînă cînd numărul diafragmului inelar al condensatorului corespunde cu numărul obiectivului întrebuinţat;

c) preparaţia de examinat se aşază pe platina microscopului; tubul microscopului se coboară pînă la poziţia de punere la punct;

d) introducem în tub, în locul ocularului, o lunetă specială, cu viză, care se află în cutia microscopului; aprindem lumina şi dăm oglinzii poziţia potrivită; privim prin lunetă, mişcînd segmentul ei superior, pînă cînd se văd clar inelul luminos al diafragmului, condensatorului şi inelul întunecos al marginii plăcuţei de fază;

e) învîrtim vizele oblice ale condensatorului pentru contrast de fază pînă cînd cele două inele apar exact concentrice;

f) înlocuim luneta specială printr-un ocular obişnuit; punem la punct şi examinăm ca de obicei. Toate detaliile preparaţiei apar admirabil de clar. Procedeul poate fi folosit nu numai la examenul preparaţiilor necolorate, celule vii, suspensii microbiene etc., dar poate fi avantajos şi pentru examinarea preparaţiilor slab colorate (rickettsii, treponeme). Dacă în cursul examenului imaginea nu se mai vede clar, în special după schimbarea preparaţiei (altă grosime de lamă), trebuie corectată din nou poziţia celor două inele cu ajutorul lunetei şi al vizelor condensatorului.

Microscopul anoptral, imaginat de Wilska, este un procedeu de microscopie prin contrast de fază negativ, în care imaginile apar clare pe un fond mai întunecat, brun. Aici inelul absorbant are o transparenţă extrem de mică, de numai 10%, ceea ce conferă metodei o sensibilitate foarte ridicată, putîndu-se astfel decela detalii care diferă foarte puţin de mediul înconjurător, ca indice de refracţie sau grosime.

Microscopia cromoanoptrală este o metodă de contrastare care, spre deosebire de contrastul de fază clasic, dă în acelaşi timp, atît imagini negative cît şi pozitive, prin simpla schimbare a punerii la punct cu viza micrometrică. În linii mari, contrastul cromoanoptral este un contrast de fază negativ, combinat cu un contrast de defocalizare pozitiv, colorat.

Imaginile negative sînt mai luminoase decît cîmpul înconjurător, care este galben, iar imaginile pozitive sînt colorate în diferite culori vii, în raport cu proprietăţile optice de refringenţă şi grosime a obiectelor. Posibilitatea trecerii continue de la imaginile negative la cele pozitive colorate, în cadrul aceluiaşi dispozitiv de microscopie, uşurează mult perceperea detaliilor extrem de fine, iar apariţia simultană, în cîmpul microscopic al imaginilor pozitive şi negative, a detaliilor situate în planuri diferite, determină apariţia unei imagini mai sintetice, viu şi nuanţat colorate, a obiectelor studiate.

Microscopul electronic

Principiul microscopiei electronice se bazează pe două constatări fundamentale. Întîi, pe constatarea că pe lîngă însuşirile lor corpusculare, electronii au şi însuşiri ondulatorii, aşa încît pot da naştere la fenomene de difracţie şi de interferenţă cu totul asemănătoare cu cele semnalate pentru lumină. În al doilea rînd, pe faptul cunoscut mai de mult că, în trecere printr-un cîmp magnetic sau electronic, electronii sînt deviaţi din calea lor într-un mod comparabil cu devierea luminii, în trecere printr-un corp cu indice de refracţie mai mare. Bobinele electromagnetice au asupra fasciculelor de electroni efecte asemănătoare cu lentilele convexe asupra fasciculelor luminoase. Cu asemenea ,,lentile electronice'' se pot obţine imagini comparabile cu imaginile luminoase obţinute cu lentilele de sticlă. Suprapunînd două lentile electronice, se realizează microscopul electronic în totul comparabil cu microscopul fotonic, compus din obiectiv şi ocular. Imaginea finală electronică este proiectată pe un ecran fluorescent, pe care devine vizibilă, sau pe o placă fotografică, care o înregistrează. Din motive tehnice, manipularea este mai complexă la microscopul electronic, succesiunea pieselor componente este inversată faţă de ceea ce este la microscopul optic; sursa de raze, condensatorul, obiectul şi obiectivul se găsesc sus, bobina proiectoare corespunzătoare ocularului şi placa fotografică sau ecranul fluorescent, care recepţionează imaginea finală, sînt jos. În principiu, lentilele electromagnetice au însă aceleaşi funcţii ca şi lentilele optice ale microscopului obişnuit. Distanţa focală a lentilelor electronice fiind reglabilă după intensitatea curentului, se pot realiza măriri diferite cu unul şi acelaşi aparat, fără a schimba bobinele, spre deosebire de microscopul optic, unde trebuie să schimbăm lentilele ocularelor şi obiectivelor pentru a modifica puterea de mărire.

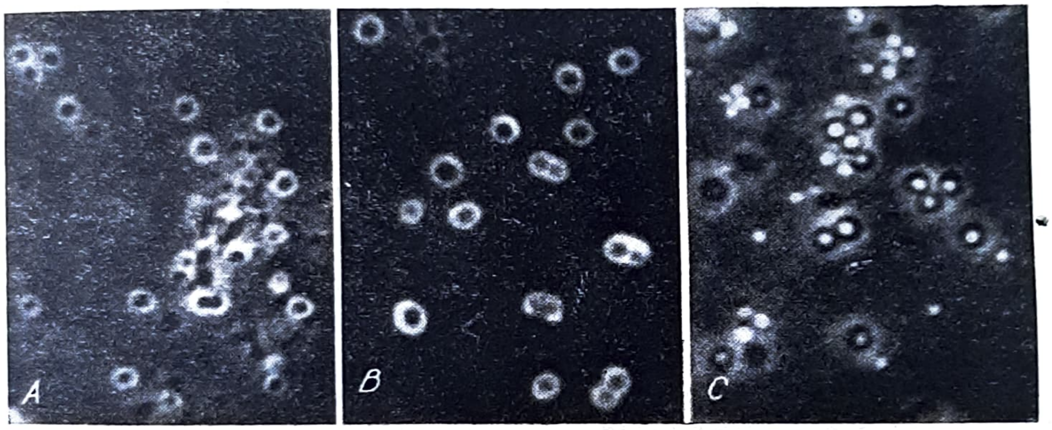


Fig. 225. — **Evidenţierea capsulei de stafilococ prin microscopie de contrast.**
A — contrast cromoanoptral pozitiv.
B — contrast de fază.
C — contrast cromoanoptral negativ (după I. Mesrobeanu şi S. Ţaga).

Progresul adus de microscopul electronic constă în faptul că funcţionarea sa, bazîndu-se pe întrebuinţarea unui agent a cărui lungime de undă este de zeci de mii de ori mai mică decît a luminii, puterea sa de rezoluţie creşte proporţional. Lungimea de undă electronică este cu atît mai mică, cu cît iuţeala de propagare a electronilor, deci diferenţa de potenţial dintre catodul generator de electroni şi anod este mai mare.

În practică, pentru studiul obiectelor biologice se realizează măriri de cîteva mii, pînă la cîteva zeci de mii de diametre, pe cînd cu microscoapele optice puterea de mărire utilă maximă este de aproximativ 1 500 de diametre. Putem, deci, studia cu microscopul electronic obiecte ale căror dimensiuni liniare sînt de zece pînă la o sută de ori mai mici decît cele văzute cu microscopul optic. Teoretic, ţinînd socoteala de dimensiunile extrem de reduse pe care le pot avea undele electronice, ar trebui să se poată evidenţia, cu microscopul electronic, obiecte încă mult mai mici. O serie de dificultăţi limitează, în practică, posibilităţile teoretice ale microscopului electronic. De pildă, un flux electronic prea rapid încălzeşte obiectul interpus, pînă la carbonizare. Datorită faptului că electronii se propagă numai în vid, pompe puternice sînt necesare spre a asigura vidul din tubul microscopului electronic, astfel că nu pot fi examinate decît preparate neanimate, în stare uscată. Obiectul de examinat se depune pe lamele port-obiect, alcătuite din foițe fine de colodiu. Dispozitive ingenioase permit schimbarea obiectului și a plăcii fotografice, fără întreruperea vidului.

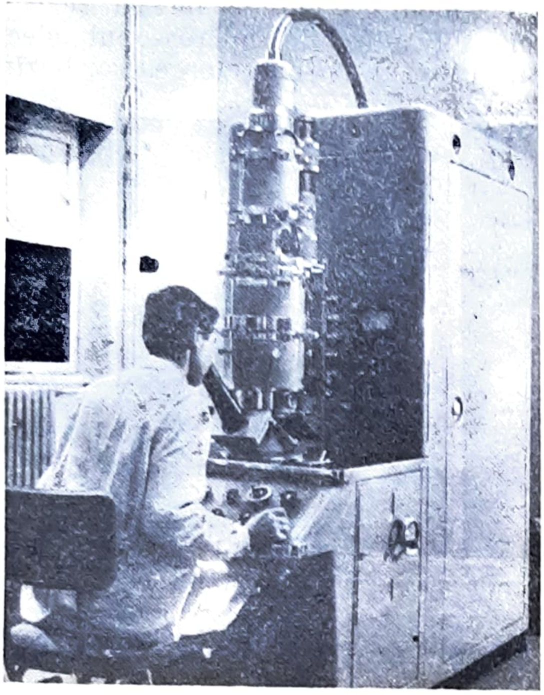


Fig. 226. — Microscop electronic.

Rezultatele obținute cu microscopul electronic sînt numeroase. S-au putut fotografia molecule mari, cum ar fi acelea de hemocianină. În jurul bacililor care secretă toxine se constată existența unei atmosfere de particule minuscule, care nu sînt altceva decît molecule de toxină; ele sînt prezente în jurul bacteriilor toxigene, cum ar fi bacilul dizenteric *Shiga*, dar nu în jurul celor netoxigene. Diverse structuri, granule, corpi denși se văd în interiorul celulelor microbiene; semnificația acestor formațiuni, invizibile cu microscopul obișnuit, se discută încă. La numeroși microbi au putut fi studiate peretele celular, ectoplasma, capsula și învelișurile mucoase. Structura cililor și originea lor în endoplasma celulară s-au precizat. Dar domeniul prin excelență al microscopului electronic este acela al virusologiei, sau inframicrobilor, domeniu puțin accesibil microscopiei obișnuite. Forma și dimensiunile virusurilor au putut fi astfel precizate. Știm astăzi, că diferențele existente, în această privință, între diferitele virusuri, sînt tot atît de mari și de specifice ca acelea dintre diversele specii microbiene. S-a putut urmări cum bacteriofagii se îndreaptă spre bacterii, se fixează pe suprafața lor, pătrund prin învelișul bacterian, se înmulțesc în interiorul bacteriei, cum aceasta se dezagregă sub acțiunea lor și cum bacteriofagii sînt din nou puși în libertate în mediul extern, prin liza bacteriei. S-a descoperit, la corpusculii bacteriofagici, un apendice caudal, care asigură probabil locomoția și care servește și ca organ de pătrundere în bacterie. Cu tot interesul acestor constatări, nu ne putem sustrage impresiei că, față de formidabila putere de rezoluție electronică teoretic posibilă, rezultatele sînt deocamdată sărace. Să nu uităm însă că microscopia electronică este recentă. Primul microscop electronic a fost realizat în 1931. Pentru prima oară, în 1936, puterea sa de rezoluție a întrecut pe aceea a microscopului optic. Microscopul electronic are deci o evoluție de-abia de 30 de ani, pe cînd microscopul optic a avut nevoie de o evoluție de peste 300 de ani, pînă a ajuns să joace rolul pe care-l are actualmente în știință.

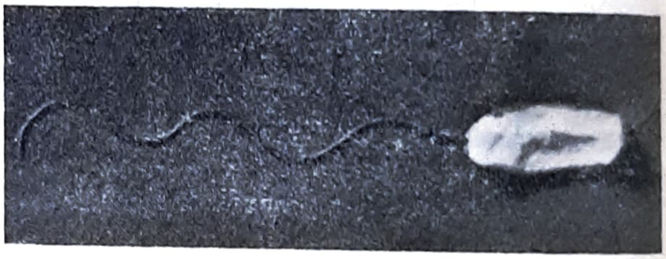


Fig. 227. — *Vibrio aquatilis*, imagine electronică (×21 000).

Tehnica umbririi preparatelor electronice. În 1944 s-a realizat un progres important, prin punerea la punct a tehnicii umbririi, prin metalizare, a preparatelor electronice. Obiectul se acoperă unilateral, prin pulverizare, cu un strat fin metalic, de obicei aur, platină, cobalt sau vanadiu, care îngreunează pătrunderea razelor electronice prin porțiunile expuse metalizării. Prin aceasta, fotografiile electronice capătă contraste și o plasticitate pe care nu o aveau altădată. Această tehnică este deosebit de utilă pentru studiul morfologiei virusurilor. Pentru biolog, marele defect al microscopului electronic este că nu îngăduie decît observarea obiectelor uscate, moarte. Dar poate că, în curînd, vor apărea aparate bazate pe alte principii, îngăduind observațiile pe viu.

BIBLIOGRAFIE

BECK C. — The microscope, Londra, 1938.

DICULESCU I. — Condensatorul 3D, o importantă descoperire în tehnica microscopică, *Anal. romîno-sovietice, Seria Biologie*, 1959, 3 (42), p. 197.

DYAKOV S. I., IVANOVA A. N., MAJCENKO A. M. — Evaluarea comparativă a metodelor de contrast de fază și contrast anoptral folosite în microbiologie, *J.M.E.I.*, 1959, nr. 12, p. 112—115.

FROBISHER M. — Fundamentals of microbiology, Ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 1953, p. 38—66.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approved Laboratory Tehnic, Ed. Appleton-Century, New-York, 1945, p. 1—18.

LANGERON M. — Précis de microscopie, Ed. Masson, Paris, 1949.

MACKIE J. T., MC. CARTNER E. J., — Handbook of practical Bacteriology, Ediția a 9-a, Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 36—53.

MEISEL M. N., KABANOVA E. A., LEVINA E. N., STRAKHOVA V. A. — Microaglutinarea luminiscentă a bacteriilor, *J.M.E.I.*, 1959, nr. 2, p. 45—51.

PEȘKOV M. A. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecțioase, G. J. Sinai și O. G. Birgher, Ed. științifică, București, 1952, p. 7—37.

POLICARD A., BESSIS M., LOCQUIN M. — Traité de microscopie, Ed. Masson, Paris, 1957.

REPENTIGNY J. — La microscopie à fluorescence en microbiologie, *Trans. roy. Soc. Can. Sec. V*, vol. 55, Seria III, iunie 1961, p. 5—14.

REPENTIGNY J., SONEA S., FRAPPIER A. — Étude microfluoremétrique des microorganismes. I. La fluorescence primaire (autofluorescence), *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, vol. 101, p. 353—366.

REPENTIGNY J., SONEA S. — Étude microfluoremétrique des microorganismes. III. La fluorescence secondaire ajoutée par des anticorps fluorescents, *Ann. Inst. Pasteur*, 1962, vol. 102, p. 182—191.

REPENTIGNY J.. SONEA S. — Détection microscopique de la fluorescence primaire chez les bactéries, *Canad. J. Microbiol.*, 1958, nr. 4, p. 17—23.

SĂSĂRMAN AL. — Bacteriologie medicală (sub redacția prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, București, 1961, p. 60—70.

SONEA S., REPENTIGNY J. — Étude microfluoremétrique des microorganismes. II. La fluorescence secondaire ajoutée par les fluorochromes, *Ann. Inst. Pasteur*, vol. 101, 1961, p. 545—558.

SONEA S., REPENTIGNY J. — Observations sur les couleurs de la fluorescence primaire des microorganismes, *Canad. J. Microbiol.*, 1960, nr. 6, p. 519—528.

SORAN V. — Folosirea microscopului cu contrast de fază în cercetările de biologie, *Nature (Lond.)*., 1961, nr. 4, p. 26—34.

STITT E. R., CLOUGH W. P., CLOUGH C. MILDRED — Practical bacteriology, hematology and animal parasitology, Ed. Lewis, Londra, 1938, p. 1—26.

TOPLEY and WILSON'S — Principles of bacteriology and immunity. Fourth Edition, Ed. Edward Arnold, 1955, p. 18—20.

ZARMA M. — O metodă de confecționare a micrometrelor oculare liniare pentru măsurători în microscopie și a micrometrelor oculare reticulare pentru numărători microscopice, *Microbiologia, București*, 1959, nr. 2, p. 171—174.

METODELE EXAMENULUI MICROBILOR PE PREPARATE NATIVE ȘI COLORATE

Prin examenul microscopic se observă forma, așezarea și mobilitatea bacteriilor, iar după colorare, proprietățile tinctoriale și unele detalii de structură.

Examenul microscopic la microscopul obișnuit se poate realiza în 3 modalități:

1. examenul microscopic al microbilor în preparate native, între lamă și lamelă;

2. examenul microscopic al microbilor pe cîmp întunecat;

3. examenul microscopic al microbilor pe preparate colorate.

Examenul microbilor în preparate native. Se poate realiza, fie direct din produsul patologic, fie dintr-o cultură microbiană între lamă și lamelă sau în picătură suspendată, pe o lamă specială cu godeu. Se examinează cu ajutorul obiectivului uscat × 40 și cu diafragmul condensatorului aproape închis.

Tehnica. Se depune cu ansa sau cu pipeta Pasteur, pe o lamă curată, degresată, o picătură din cultura în mediu lichid sau dintr-o suspensie în ser fiziologic dintr-o cultură pe geloză moale. Este de preferat ca suspensia să se facă dintr-o colonie izolată. Picătura se acoperă cu o lamelă curată și se așază pe platina microscopului. Se examinează apoi cu obiectivul uscat 40 ×, după ce în prealabil s-a diminuat luminozitatea prin închiderea diafragmului iris al condensatorului.

Examenul în picătură suspendată se efectuează asemănător, cu deosebirea că suspensia bacteriană se așază în centrul unei lamele pe care se aplică apoi lama cu godeu, în așa fel încît picătura să fie în dreptul scobiturii lamei. Adeziunea lamelei la lamă se realizează prin umezirea prealabilă a marginilor lamelei cu puțină apă, de jur împrejurul picăturii. Se întoarce preparatul cu lamela în sus și se examinează ca și preparatul umed dintre lamă și lamelă.

Mișcarea activă proprie a bacteriilor datorită cililor trebuie deosebită de mișcarea browniană. Mișcările proprii ale bacteriilor se realizează individual în toate sensurile cîmpului microscopic, pe cînd cea browniană este imprimată tuturor bacteriilor din cîmp într-un sens sau în altul. Atunci cînd cultura este prea densă și numărul bacteriilor este foarte mare în cîmpul microscopic, observația este stînjenită, pentru că nu putem observa mișcările individuale ale bacteriilor. În acest caz repetăm examenul, diluînd suspensia microbiană în ser fiziologic.

Examenul pe cîmp întunecat se folosește pentru observarea unor anumite bacterii care posedă proprietatea de refringență și astfel se evidențiază deosebit de clar în cîmpul microscopic. În practică se utilizează la diagnosticul sifilisului în faza primară, prin examenul direct al serozității din șancru și în diagnosticul de laborator al leptospirozelor, pentru controlul culturilor și citirea reacției de aglutinare-liză a leptospirelor.

Examenul microbilor pe preparate colorate. Înainte de a expune metodele de colorare folosite în microbiologie, este necesar să precizăm unele noțiuni asupra compoziției coloranților și modului lor de preparare.

Se disting două mari grupe de coloranți: unii care impregnează difuz obiectele și alții care se fixează electiv pe anumite elemente celulare, totdeauna aceleași, pe care le pun astfel în evidență. Ne vom ocupa numai de aceștia din urmă, coloranții electivi, cei care permit să se realizeze diferențieri optice și deci să se pună în evidență detalii citologice și histologice.

Coloranții întrebuințați în tehnica bacteriologică sînt compuși sintetici, din grupul anilinei, extrași din gudroanele de huilă. Colorațiile efectuate cu acești coloranți pot fi: colorații simple, care se obțin prin acțiunea unui singur colorant, acid sau bazic, și colorații combinate, realizate prin acțiunea a doi sau mai mulți coloranți, care acționează succesiv sau simultan. În funcție de scopul urmărit, colorațiile simple se împart în:

— colorații nucleare, efectuate cu coloranți bazici;

— colorații citoplasmatice, efectuate cu coloranți acizi.

Majoritatea microbilor se colorează cu coloranți bazici, mai rar cu coloranți acizi sau neutri. Dintre coloranții bazici cei mai întrebuințați sînt:

— albastrul de metilen
— albastrul de toluidină
— cristal violet
— fucsină bazică
— fucsină violet
— violet de gențiana
— violet de metil
— verde briliant
— verde de metil
— tionină
— vezuvină etc.

Dintre coloranții acizi se întrebuințează mai des: fucsina acidă, eozina, roșul de Congo, eritrozina etc.

În cazul în care coloranții simpli dau o singură nuanță cromatică tuturor elementelor, ei sînt monocromi, spre deosebire de coloranții simpli metacromatici, care fac să vireze culoarea în nuanțe diferite pentru anumite detalii. Acest viraj metacromatic al unor coloranți este datorit intrării în reacție a esterilor sulfurici cu greutate moleculară mare.

În ceea ce privește colorația combinată, ea nu trebuie confundată cu colorația panoptică.

Deosebirea constă în aceea că, în timp ce în colorația combinată intră coloranți bazici sau acizi, elementele colorației panoptice sînt coloranți neutri, care au scopul de a pune în evidență un număr cît mai mare de detalii, cu o cît mai mare varietate de nuanțe: tip de colorație panoptică este metoda Romanovski-Giemsa. În microbiologie coloranții se folosesc sub formă de:

— soluții apoase, care nu rezistă timp îndelungat;

— soluții saturate alcoolice cu durabilitate indefinită, din care se prepară soluțiile apoase.

În general, la soluțiile apoase se adaugă fenolul ca mordant.

Prepararea coloranților. Prepararea soluției saturate:

Alcool de 96°	100 ml
Colorant	10–15 g

Se mojarează colorantul cu o parte de alcool și apoi se adaugă în porțiuni mici restul alcoolului, căutînd să îndepărtăm toată substanța colorantă din mojar.

Amestecul se ține cîteva zile la termostat, pentru maturare, în flacoane închise etanș, agitînd din cînd în cînd; apoi se păstrează la temperatura camerei, la adăpost de lumină. Din această soluție saturată sau soluție mamă se prepară apoi soluția apoasă.

Prepararea soluțiilor apoase, plecînd de la soluția saturată, se face astfel:

Soluție saturată filtrată	10 ml
Fenol cristalizat	2 ml
Apă distilată	100 ml

În mod obișnuit se prepară apă fenolată 2% în care se înglobează cei 10 ml de soluție saturată filtrată.

TABELUL 92

Tehnica preparării coloranților în soluții hidro-alcoolice-fenicate

Substanța colorantă		Alcool absolut	Acid fenic cristalizat	Apă distilată
Violet gențiana	1 g	10 ml	2 g	90 ml
Albastru de toluidină sau metilen	1,5 g	10 ml	2 g	90 ml
Fucsină bazică	1 g	10 ml	5 g	90 ml
Tionină	1 g	10 ml	5 g	90 ml
Safranină	1 g	10 ml	—	90 ml

Alt mod de preparare a coloranților, fără a utiliza o soluție saturată, îl constituie metoda soluțiilor hidro-alcoolice. În felul acesta se pot prepara cei mai mulți coloranți folosiți în microbiologie.

Se mojarează într-un mojar curat colorantul cu alcoolul absolut, se adaugă acidul fenic, apoi în cantități fracționate, amestecînd mereu, apă distilată 60 ml. Se trece amestecul într-o sticlă brună, se spală cu restul de 30 ml apă distilată mojarul și se adaugă la restul amestecului. Se lasă în repaus 24 de ore, se decantează sau se filtrează. Se conservă în sticlă de culoare închisă, la adăpost de lumină.

Albastru alcalin Löffler

Albastru de metilen, soluție saturată filtrată	30 ml
Hidroxid de K 10%	2 picături
Apă distilată	100 ml

În microbiologie se întrebuințează destul de des mordanții. Mordantul are rolul de a favoriza combinarea chimică între două corpuri, care nu au nici o afinitate chimică unul pentru altul. Pe de o parte el sensibilizează, în anumite condiții, țesutul, formînd cu el o combinație stabilă, accentuîndu-i astfel electivitatea pentru colorant, și pe de altă parte, el poate produce cu colorantul un precipitat mai intens colorat și insolubil în apă. Unul din mordanții cei mai utilizați în microbiologie este

Soluția Lugol

Iod metalic	1 g
Iodură de K	2 g
Apă distilată	300 ml

Se dizolvă iodura de K în apă și ulterior se adaugă iodul metalic. Soluția trebuie apărată de acțiunea luminii și a căldurii, deoarece, sub influența acestor factori se formează acid iodic, care modifică compoziția soluției. Dacă are reacție acidă la turnesol, soluția trebuie neutralizată cu bicarbonat.

Amestec decolorant pentru Gram

Alcool-acetonă:

Alcool 96°	3 părți
Acetonă	1 parte

Pentru acest amestec se cere ca alcoolul să fie cît mai aproape de 96°. Scăderea concentrației chiar la 80°—85° face ca decolorantul să nu mai diferențieze bine germenii gram-pozitivi de cei gram-negativi.

Amestec decolorant pentru acido-alcoolo-rezistenți

Alcool-acid:

Acid clorhidric concentrat	3 părți
Alcool de 70°	97 părți

Colorația microbilor

Colorația se face folosind preparate cu:

1. microbi vii (colorația vitală), mai rar întrebuințată;

2. microbi omorîți, fixați prin căldură, metodă de întrebuințare curentă.

Colorația vitală: dă informații asupra structurii nucleului și citoplasmei, incluziilor celulare etc. fără a altera celula bacteriană. Coloranții mai des întrebuințați sînt: roșul neutru, violetul de dahlia, verdele briliant, albastrul de tripan etc.

Colorația frotiului fixat. Prepararea frotiului pentru colorație:

a) Pentru prepararea frotiurilor din cultură se va pune, cu ansa sau cu pipeta Pasteur, o picătură mică de ser fiziologic sau apă sterilă pe o lamă bine degresată. În picătura de ser fiziologic se amestecă o cantitate mică de cultură recoltată dintr-o colonie izolată.

Suspensia rezultată trebuie să fie omogenă şi puţin densă, astfel ca microbii să apară într-un singur strat la examinare. Frotiul astfel realizat se lasă să se usuce la temperatura camerei.

b) Frotiurile din produse patologice, puroi, spută etc. trebuie făcute din partea cea mai caracteristică a produsului şi cu grija de a fi întinse uniform şi în strat cît mai subţire.

c) Frotiurile din organe se fac prin impresiuni, adică prin apăsarea unui fragment de organ pe lamă.

d) Frotiul de sînge se face întinzînd în strat subţire şi continuu, pe suprafaţa unei lame bine degresate, o picătură de sînge, cu marginea unei alte lame şlefuite sau cu o lamelă. Frotiurile astfel preparate se usucă la temperatura camerei. Cînd preparatul este complet uscat, se procedează la fixare, care are două scopuri : pe de o parte, de a produce aderarea preparatului pe suprafaţa lamei, şi pe de altă parte, de a păstra forma celulelor şi microbilor. Această fixare, constă, în esenţă, în coagularea albuminelor şi se obţine, fie prin căldură, fie cu ajutorul aşa-numiţilor fixatori. În cazul fixării prin căldură se va trece de 2—3 ori lama cu frotiul deasupra flacării unui bec de gaz. Toată operaţia nu trebuie să dureze mai mult de 5—6 secunde, preparatul fiind în timpul acestei manipulări aproximativ 2 secunde în flacără.

Fixarea trebuie realizată progresiv, pentru a nu produce o evaporare bruscă a apei din conţinutul celulei, fapt care ar duce la apariţia de vacuole în protoplasmă şi ar altera preparatul.

În general, scopul metodelor de fixare este de a obţine un preparat stabil, în care forma şi dimensiunea celulelor studiate, precum şi structura cea mai fină a protoplasmei să rămînă, pe cît posibil, neschimbate. Fixarea prin căldură nu respectă întocmai aceste condiţii. Dacă forma bacteriilor rămîne aceeaşi, volumul şi structura celulară suferă unele modificări. Studiul cililor, protoplasmei sau al nucleului nu se poate face pe preparate fixate cu acest procedeu.

În acest scop se foloseşte fixarea cu ajutorul fixatorilor chimici. Aceştia pot fi :

— alcoolul metilic, cu o durată de fixare de 5—10 minute ;
— alcoolul etilic, cu o durată de fixare de 20 minute ;
— amestec de alcool etilic şi eter în părţi egale, cu o durată de fixare de 20 de minute ;
— amestec de alcool 0,5 ml şi formol 5 ml cu o durată de fixare de 15 minute.

După fixare se va trece la colorarea preparatelor.

Mecanismul coloraţiei bacteriilor se realizează printr-o serie de interacţiuni fizice şi chimice între colorant şi componentele celulei bacteriene. Colorarea bacteriilor depinde, atît de structura chimică a colorantului, cît şi de compoziţia chimică a celulei. O serie de factori intervin în procesul de colorare : s-a constatat că atît timp cît activitatea metabolică a celulei bacteriene nu a fost dezechilibrată, fenomenul de colorare nu are loc. În acest sens pledează şi faptul că cea mai mare parte a factorilor care opresc activităţile metabolice şi provoacă denaturarea componenţilor celulei măresc afinitatea tinctorială a celulei. Prin procedeul de fixare a bacteriilor se realizează, în afară de fixarea propriuzisă şi o permeabilizare a celulei pentru acţiunea colorantului, prin oprirea desfăşurării proceselor metabolice celulare şi printr-un anumit grad de denaturare a componentelor celulare.

În ceea ce priveşte structura chimică a celulei, s-a constatat că substanţele proteice joacă un rol important în acest proces. Nucleoproteinele, în special prin numărul mare de grupări liniare din compoziţia lor, măresc în mod deosebit afinitatea tinctorială pentru coloranţii bazici. Prezenţa acidului ribonucleic dispersat în toată citoplasma explică colorabilitatea celulelor bacteriene prin coloranţii bazici.

În general însă, preponderenţa grupărilor acide sau bazice existente în protoplasma unor specii bacteriene face ca acestea să prezinte o afinitate variată faţă de coloranţii acizi sau bazici. De asemenea, s-a atribuit un rol pH local, care prin variaţiile sale favorizează acţiunea unora sau altora dintre coloranţi. Colorarea frotiurilor fixate se face prin mai multe metode :

a) metode de coloraţie simplă ;
b) metode de coloraţie dublă ;
c) metode de coloraţie specială.

Se va întrebuinţa una sau alta din aceste metode, după scopul urmărit în observaţia microscopică.

a) *Coloraţia simplă:* oferă posibilitatea de a studia rapid şi uşor morfologia bacteriilor. Pentru aceasta se folosesc coloranţi în soluţii apoase ; de exemplu, frotiul fixat este acoperit cu :

— soluţie apoasă de albastru de metilen 1—2 minute;
— spălare cu apă;
— uscare.

La examenul microscopic bacteriile apar colorate în albastru închis, iar fondul preparatului în albastru deschis. În acelaşi fel se pot folosi şi alţi coloranţi ca albastru de toluidină, fucsină fenicată, violet de genţiana etc.

b) *Coloraţia dublă*: este o coloraţie diferenţială.

Metoda Gram

Metoda Gram cu dublă coloraţie foloseşte violetul de genţiana şi fucsina, permiţînd clasificarea microbilor în două categorii: microbi *gram-pozitiv* şi *gram-negativ* în funcţie de compoziţia chimică a celulei microbiene. Microbii gram-pozitiv sub acţiunea succesivă a violetului de genţiana şi a Lugolului se colorează în violet şi rezistă la decolorare cu alcool-acetonă, datorită unui complex insolubil, care se realizează între colorant, soluţia iodo-iodurată şi o sare a acidului ribonucleic, ribonucleatul de magneziu. Acest complex insolubil în alcool-acetonă se realizează numai la acele bacterii în a căror structură celulară există o cantitate suficientă de ribonucleat de magneziu.

Tehnica. Se acoperă frotiul fixat prin căldură cu:
— violet de genţiana sau cristal violet şi se colorează timp de 1 minut;
— se aruncă violetul, fără a spăla şi se acoperă lama cu Lugol, se menţine timp de 2 minute;
— se îndepărtează Lugolul de pe lamă;
— se decolorează cu alcool-acetonă, cîteva secunde, pînă cînd amestecul de alcool-acetonă se scurge necolorat de pe lamă;
— se spală cu apă de robinet;
— se recolorează preparatul cu fucsină fenicată diluată 1/10, timp de 1 minut;
— se spală cu apă de robinet;
— se usucă la aer sau cu ajutorul unei hîrtii de filtru.

La examenul microscopic, microbii gram-pozitiv apar coloraţi în violet, cei gram-negativ în roşu, fondul preparatului în roşu.

Metoda Ziehl-Neelsen

Coloraţia Ziehl-Neelsen se întrebuinţează pentru studiul microbilor acidoalcoolorezistenţi (bacilii tuberculozei, leprei etc.) care, prin compoziţia chimică specială, o dată coloraţi nu mai pierd culoarea chiar sub acţiunea decolorantă a unui acid mineral diluat, a alcoolului sau a unui amestec de alcool-acid.

În prezent au fost demonstraţi doi factori ca fiind răspunzători de acidoalcoolorezistenţă: constituenţii lipidici şi permeabilitatea selectivă a membranei celulare. Dintre constituenţii lipidici rolul mai important în conferirea proprietăţii de acido-rezistenţă îl au acidul micolic şi unele lipopolizaharide. În ceea ce priveşte permeabilitatea selectivă a membranei celulare, ea este condiţionată de aşezarea acestor constituenţi lipidici la periferia celulei. În ansamblu însă, cei doi factori se găsesc într-o strînsă interdependenţă, în sensul că, pe de o parte, selectivitatea membranei celulare este dictată de prezenţa anumitor componente de natură lipidică, iar pe de altă parte, absenţa integrităţii membranei anulează eficienţa factorului lipidic.

Tehnica. Se acoperă lama complet cu:
— fucsină fenicată Ziehl;
— se încălzeşte de trei ori pînă la emiterea de vapori; se completează cu colorant, dacă acesta scade prin evaporare, astfel ca lama să fie în permanenţă complet acoperită cu fucsină;
— se lasă să se răcească;
— se decolorează cu alcool;
— se spală cu apă de robinet;
— se decolorează cu acid sulfuric 1/4, sau acid azotic 1/3, pînă nu mai apare culoarea roşie şi se spală cu apă. Se mai poate folosi pentru decolorare un amestec de alcool-acid;
— se spală lama cu apă de robinet;
— se recolorează cu albastru de metilen 1% sau verde malahit 0,5%, timp de 1—2 minute;
— se spală cu apă de robinet;
— se usucă.

La examenul microscopic, bacilii acido-rezistenţi apar coloraţi în roşu; ei au rezistat la decolorare cu acid şi alcool, iar ceilalţi microbi şi fondul preparatului apar în albastru sau verde.

Coloraţia Fontes

Se colorează frotiul cu fucsină Ziehl la cald 2 minute. Se spală cu apă de robinet. Se recolorează cu violet de genţiana fenicat, la rece, timp de două minute. Se aruncă colorantul, se spală cu Lugol de trei ori şi apoi se acoperă lama cu Lugol şi se lasă să acţioneze un minut.

Se decolorează apoi complet preparatul cu alcool-acetonă. Se spală cu apă de robinet. Se recolorează fondul preparatului cu albastru de metilen diluat 1 minut. Bacilii tuberculoşi apar roşii, cu granulaţii violete. Această metodă pune în evidenţă un detaliu de structură, granulaţiile Much, care sînt gram-pozitive.

În frotiurile din abcesele reci nu se poate pune în evidenţă prezenţa bacililor tuberculoşi, dar prin coloraţia Fontes apar granulaţiile Much, detaliu structural al bacililor tuberculoşi.

c) *Coloraţii speciale:* se întrebuinţează pentru a pune în evidenţă anumite detalii morfologice ale microbilor ca spori, capsulă, cili, granulaţii metacromatice etc., sau pentru a observa anumite caractere structurale, de fineţe, ale celulei bacteriene.

Coloraţia capsulei

(*metoda Johne*)

— fucsină fenicată	1—2 minute
— acid acetic soluţie 1—2%	10 secunde
— spălare cu apă	
— uscare.	

La examenul microscopic microbii apar coloraţi în roşu, iar capsula în roz.

Coloraţia capsulei

(*metoda Hiss*)

1. Soluţie alcoolică saturată de violet de genţiana	1 parte
2. Apă distilată	19 părţi
3. Soluţie de sulfat de Cu 20% în apă distilată.	

Se fac frotiuri subţiri, uscate şi fixate prin căldură. Se acoperă cu colorant, se încălzeşte pînă la apariţia de vapori. Se lasă 30 de secunde.

Se spală colorantul cu soluţie de sulfat de Cu, fără spălare cu apă. Se usucă, se examinează cu imersie. Bacilii apar violeţi, capsula roz.

Coloraţia sporilor

(*metoda Pooman*)

— Frotiul se acoperă cu fucsină Ziehl;
— se încălzeşte de 2—3 ori pînă la apariţia de vapori;
— decolorare cu acid sulfuric 1‰;
— spălare cu apă;
— recolorare cu albastru de metilen alcalin timp de 2 minute;
— spălare cu apă.

La examenul microscopic sporii apar coloraţi în roşu, iar formele vegetative în albastru.

Coloraţia sporilor cu verde malahit

— Lamele fixate prin căldură se acoperă cu o soluţie de verde de malahit 5%;
— se încălzeşte pînă la emiterea de vapori, se lasă să se răcească frotiul, se îndepărtează colorantul. Se repetă operaţia de 3 ori, punînd colorant proaspăt înainte de fiecare încălzire;
— se lasă să se răcească lama;
— se spală cu apă de robinet;
— se colorează cu fucsină diluată 1/10, timp de 30 de secunde;
— se spală, se usucă, se examinează cu imersie.

La examenul microscopic corpii microbieni vor apărea coloraţi în roz-roşu şi sporii în verde.

Coloraţia sporilor

(*metoda Möller*)

— fixare cu alcool absolut 2 minute
acid osmic 5% 5 minute
— spălare cu apă de robinet
— colorare cu fucsină Ziehl prin încălzire de 3 ori pînă la emiterea de vapori;
— decolorare rapidă cu acid azotic 1/4;
— spălare cu apă;
— recolorare cu albastru de metilen 1% timp de 2 minute;
— spălare cu apă;
— uscare la aer.

La examenul microscopic sporii apar coloraţi în roşu, iar bacilii în albastru.

Coloraţia cililor

(*metoda Zellnov, modificată de Condrea şi Petrovici*)

Prepararea culturilor. Culturile bacteriilor aerobe, după cîteva treceri în bulion, se însămînţează în suprafaţă pe o geloză inclinată proaspătă, cu lichid bogat de condensare. La 18—20 de ore se ia cu o ansă o cantitate mică de cultură de pe geloză şi se suspendă în 3—4 ml apă distilată. Manopera nu trebuie să fie brutală, pentru a nu produce detaşarea şi fragmentarea cililor. Din această suspensie perfect omogenă se vor face frotiurile pentru coloraţie. Pentru bacteriile anaerobe se fac însămînţări în tuburi cu bulion, cărora li se toarnă un strat de parafină topită şi sterilă, la suprafaţa mediului. După cultivare se formolizează cultura cu 1 ml formol 10% la un tub cu 10 ml cultură. Se lasă în repaus cîteva zile, pentru a se depune germenii, apoi se îndepărtează supernatantul, iar depozitul se spală cu apă distilată formolată 10% de 3 ori, la interval de 5—6 zile. După ultima spălare, depozitul microbian se reia în 3—4 ml apă distilată şi se realizează astfel suspensia din care se va pregăti frotiul.

Lamele folosite vor fi noi şi subţiri, foarte curate şi degresate. Materialul necesar coloraţiei este următorul :

Mordantul, format din două soluţii :
– Soluţie de tartrat stibiat 5%
– Soluţie tanin 5%.

La soluţia de tanin 5% se adaugă puţin cîte puţin soluţie de tartrat stibiat 5%, pînă cînd amestecul devine lăptos prin agitare. Acest amestec pus în baie de apă, la 60—70°, trebuie să devină perfect limpede. Dacă la această temperatură nu s-a limpezit, înseamnă că tartratul stibiat este în exces. Pentru limpezire se adaugă din soluţia de tanin, pînă la clarificare perfectă. Acest amestec, răcit la temperatura camerei, trebuie să redevină tulbure. Se poate aştepta 24 de ore şi dacă în acest interval nu s-a produs tulbureala amestecului, se va mai adăuga, cu multă prudenţă, picătură cu picătură din soluţia de tartrat stibiat, agitînd pînă la uşoară tulburare. Mordantul, pentru a fi utilizabil, trebuie să fie limpede la temperatura de 60—70° şi tulbure la temperatura camerei.

Soluţia argentică. Se dizolvă : 5 g nitrat de argint şi 6 g sulfat de sodiu cristalizat în cîte 15 ml apă distilată. Se amestecă cele două soluţii. Se formează un precipitat de sulfat de argint care se depune complet. După îndepărtarea supernatantului, precipitatul se spală de 3 ori cu cîte o cantitate de 30 ml apă distilată, apoi este reluat în 500 ml apă distilată. Aceasta este soluţia stoc de sulfat de argint, care se păstrează în flacon brun la întuneric.

În momentul întrebuinţării se ia 10 ml soluţie stoc, căreia i se adaugă picătură cu picătură dintr-o soluţie de amoniac diluată 1/2. Se va forma, la început, un precipitat brun, care ulterior se va dizolva complet, printr-un adaos de amoniac.

Cînd soluţia este limpede, se adaugă cu picătura din soluţia stoc de sulfat de argint, pînă cînd apare o uşoară opalescenţă, care persistă. Se obţine astfel soluţia de sulfat de argint amoniacal.

Tehnica impregnării argentice. Din suspensia microbiană se ia, cu o pipetă Pasteur cu vîrful efilat, o mică cantitate, care se va depune la unul din capetele lamei, prin atingere cu vîrful pipetei. Lama trebuie să fie bine degresată, ceea ce se traduce prin întinderea spontană a picăturii. Este recomandabil ca picătura să fie mică, pentru ca uscarea să se facă rapid şi prin aceasta să se realizeze o dispersie uniformă a microbilor. În cazul unei picături mai mari, uscarea va fi încetinită şi germenii se vor aglomera la periferie. Pe acelaşi frotiu, alături de preparatul făcut cu bacteria de cercetat, se va face un frotiu cu o bacterie sigur ciliată, care va servi ca martor pentru reuşita coloraţiei.

Suspensiile vii, după uscare completă, se cufundă pentru cîteva minute într-o baie de formol 1%.

Lamele astfel preparate se introduc într-o bae Laveran sau pahar Borrel, acoperindu-se cu soluţia de mordant, şi totul este aşezat în baie de apă la 60 — 70°, pentru 1—2 ore. În acest timp temperatura nu trebuie să depăşească 70°, pentru a nu fi distruşi cilii. După 1—2 ore lamele se scot din baie şi se spală imediat cu grijă, cu apă de robinet şi apoi cu apă distilată. Se lasă să se usuce. Se introduc lamele într-un pahar Borrel cu soluţie de sulfat de argint amoniacal. Se trece paharul într-o baie la 70°, urmărindu-se momentul cînd preparatul capătă o culoare neagră-cenuşie. Se scot lamele, se spală cu apă distilată, apoi se usucă.

Preparatul se montează în ulei de cedru şi se acoperă cu o lamelă. La examenul microscopic, atît cilii, cît şi corpii microbieni apar coloraţi în negru, corpii microbini fiind uşor măriţi de volum.

Coloraţia treponemelor şi leptospirelor

(*Metoda Fontana-Tribondeau*)

Sînt necesari următorii reactivi :

Soluţia Ruge :

Formol comercial	20 ml
Acid acetic	1 ml
Apă distilată	100 ml

Soluţia de acid tanic 5% :

Acid tanic	5 g
Apă distilată	100 ml
Acid fenic	1 ml

Se filtrează înainte de întrebuinţare

Soluţia de nitrat de argint :

Nitrat de argint	0,25 g
Apă distilată	100 ml.

Soluţia amoniacală de nitrat de argint se prepară în momentul impregnării argentice. Peste o cantitate din soluţia de nitrat de argint se toarnă picătură cu picătură amoniac, pînă cînd precipitatul devine opalescent. Se filtrează. Lichidul clar obţinut se foloseşte la impregnare.

Tehnica impregnării. Frotiurile nefixate, uscate, sînt acoperite cu soluţie fixatoare Ruge, care se lasă să acţioneze 1 minut, apoi se schimbă lichidul de pe lamă şi se lasă încă 1 minut. Se spală cu apă distilată. Se acoperă cu soluţia de acid tanic 5%. Se încălzeşte pînă la apariţia de vapori şi se lasă să acţioneze 2–3 minute la cald. Se spală cu apă distilată. Se acoperă cu soluţia amoniacală de nitrat de argint. Se încălzeşte pînă la emisiunea de vapori, se lasă 2 minute, apoi se reînnoieşte soluţia de nitrat de argint, se încălzeşte încă o dată la emisiune de vapori şi se lasă să acţioneze colorantul la cald încă 2 minute. Se spală cu apă distilată, se usucă şi se examinează cu imersie.

La examenul microscopic bacteriile apar colorate în brun închis, pe fond galben-brun. Grosimea lor însă va fi exagerată prin impregnarea argentică. Spirele treponemelor sau leptospirelor nu vor fi regulate şi uneori sînt atenuate sau dispar unilateral. În acest fel de preparate, treponemele şi leptospirele apar mai numeroase la marginea frotiului şi trebuie căutate cu atenţie în aceste zone ale preparatului.

Colorarea corpusculilor metacromatici

(după metoda Neisser)

Metoda este folosită pentru punerea în evidenţă a corpusculilor metacromatici Babeş-Ernst, prezenţi la bacilul difteric.

Colorantul Neisser este format din:

Soluţia A

Albastru de metilen	1 g
Alcool absolut	50 ml
Acid acetic glacial	50 ml
Apă distilată q.s.	1000 ml

Soluţia B

Cristal violet	1 g
Alcool absolut	10 ml
Apă distilată	300 ml

În momentul întrebuinţării se amestecă două părţi soluţie A cu o parte soluţie B.

Soluţie de Lugol acidulat:

Soluţia Lugol	100 ml
Acid acetic concentrat sau Acid lactic	1 ml

Soluţia crizoidină sau vezuvină:

Crizoidină	1 g
Apă distilată	100 ml

Prepararea acestei soluţii se face la cald şi apoi se filtrează.

Tehnica coloraţiei. Frotiul uscat şi fixat se acoperă cu colorant Neisser (2 părţi soluţia A şi o parte soluţia B), timp de 1–2 minute;

— se spală;

— se tratează cu soluţie Lugol acidulată 10–30 de secunde;

— se spală;

— se colorează cu soluţie de crizoidină 15 secunde;

— se spală, se usucă, se examinează cu imersie; corpii microbieni apar coloraţi în galben-brun, iar corpusculii metacromatici în albastru.

Coloraţia May-Grünwald-Giemsa

Necesară în special pentru colorarea preparatelor de sînge.

Timpul 1. Se acoperă lama cu 20–30 de picături de soluţie May-Grünwald. Se adaugă acelaşi număr de picături de apă distilată neutră. Se lasă să acţioneze încă 3 minute. Este faza de colorare a soluţiei May-Grünwald.

Timpul 2. Se aruncă amestecul May-Grünwald şi se aşază lama într-o baie Laveran cu soluţie Giemsa preparată extemporaneu în felul următor: la 2 ml apă distilată neutră se adaugă 3 picături din soluţia de colorant original Giemsa. Se menţin în baie 20–30 de minute sau prelungit, pînă la cîteva ore. Se spală cu apă de robinet. Se usucă. Se examinează cu imersie.

În această dublă coloraţie, întrebuinţarea succesivă a soluţiei May-Grünwald şi a soluţiei Giemsa permite o colorare panoptică completă a elementelor sanguine dintr-un frotiu. Soluţia May-Grünwald colorează mai ales elementele acidofile ale preparatului şi granulaţiile neutrofile ale leucocitelor. Soluţia Giemsa colorează nucleii celulelor şi părţile azurofile. Separat, fiecare din aceste metode dă o coloraţie incompletă, căci soluţia May-Grünwald colorează slab nucleii şi soluţia Giemsa nu colorează granulaţiile neutrofile şi acidofile.

EXAMENUL MICROSCOPIC AL PREPARATELOR COLORATE

Frotiul colorat şi uscat se examinează la microscop cu obiectivul 3, pentru a căuta cîmpul cel mai favorabil, apoi cu obiectivul cu imersie. Pentru acest examen microscopul trebuie mînuit astfel ca să îndeplinească următoarele condiţii:

— condensatorul trebuie să fie la nivelul platinei;

— diafragmul iris complet deschis;

— oglinda concavă, cînd sursa de lumină este aproape;

— oglinda dreaptă, cînd sursa de lumină este depărtată;

— se pune o picătură de ulei de cedru pe frotiu;

— se centrează lumina cu ajutorul obiectivului 3;

— se așază lama pe platina microscopului, fixînd-o cu cavalerii;

— cu viza macrometrică se coboară tubul microscopului, pînă cînd imersia intră în uleiul de cedru; operația se face privind lateral;

— se privește apoi prin ocular, ridicînd încet tubul, pînă cînd apare imaginea preparatului;

— cu ajutorul vizei micrometrice, imprimăm mișcări mici în ambele sensuri, pînă cînd imaginea devine clară;

— după examinare se ridică tubul cu obiectivul, se scoate lama, se șterge uleiul de cedru de pe obiectiv cu pulpa degetului și se așază microscopul în cutia protectoare, sub un clopot de sticlă, sau sub husa de plastic.

BIBLIOGRAFIE

ANDREESCU VIORICA — Bacteriologie medicală (sub redacția prof. N. Nestorescu și colab.), Ed. medicală, București, 1961, p. 71—81.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, Ediția a 2-a, Ed. Masson Paris, 1957, p. 167—174.

HALLMANN L. — Bakteriologie und serologie, Ediția a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 620—623.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approved laboratory techniques, Ed. Appleton-Century, 1945, p. 372—388.

MACKIE J. T., MC. CARTNEY E. J. — Handbook of practical bacteriology, Ediția a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburg, 1956, p. 53—83.

PEȘKOV M. A. — Diagosticul microbiologic al bolilor infecțioase, G. J. Sinai și O. G. Birgher, Ed. științifică, București, 1952, p. 37—67.

SĂSĂRMAN AL. — Bacteriologie medicală (sub redacția prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, București, 1961, p. 39—60 („Morfologie bacteriană").

TOPLEY AND WILSON'S — Principles of Bacteriology and Immunity, Fourth edition, Ed. Edward Arnold, 1955, vol. 1, 41—44.

WHITBY L., HYNES M. — Medical bacteriology, Ediția a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 22—34.

ZINSSER J. — Textbook of Bacteriology, Ediția a 11-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New-York, 1957, p. 14—17.

METODELE DE STERILIZARE ȘI DEZINFECȚIE

Prezența ubicuitară a microorganismelor în mediul extern, în cavitățile naturale și pe tegumentele și mucoasele organismului uman și animal impun reguli anumite pentru studierea unui microb, în vederea diagnosticului microbiologic.

Pentru a putea studia o bacterie este necesar izolarea ei în cultură pură, pe medii artificiale.

Toate operațiile necesare studierii unei bacterii trebuie realizate în mod aseptic, iar însămînțările produselor patologice, în vederea izolării microbilor, se fac în medii sterile.

Prin sterilizare înțelegem distrugerea tuturor microorganismelor dintr-un mediu sau de pe un obiect, atît sub forma lor vegetativă, cît și cea sporulată.

Metoda de sterilizare se alege, de la caz la caz, după materialul de sterilizat (instrumente de metal, sticlă, cauciuc, medii de cultură, pansamente etc.), pentru a nu deteriora obiectul supus sterilizării.

Sterilizarea poate fi realizată prin:

I. *Agenți fizici*
  A. Căldura: *1)* căldura umedă
    2) căldura uscată
  B. Filtrarea
  C. Energia radiantă
  D. Vibrațiile ultrasonice.

II. *Agenți chimici*
  A. Substanțe bactericide sau bacteriostatice
  B. Substanțe dezinfectante.

I. STERILIZAREA PRIN AGENȚI FIZICI

Constituie metoda de sterilizare des întrebuințată în toate ramurile medicinei.

A. CĂLDURA

Realizează distrugerea formelor vegetative și a sporilor bacteriilor, în 30 de minute la 120—134° căldură umedă, și în 60 de minute la 180° căldură uscată.

Mecanismul sterilizării prin căldură este explicat prin degradarea proteinelor celulei bacteriene. O celulă microbiană moare prin coagularea albuminelor, sub acțiunea căldurii. Coagularea albuminei se face cu atît mai rapid, cu cît conținutul celulei în apă este mai mare. Prezența apei în celulă permite o pătrundere mai rapidă a căldurii.

1. **Căldura umedă** se întrebuințează sub forma de: fierbere, vapori de apă sub presiune la 120°, vapori de apă la 100°, tindalizare, pasteurizare. Căldura umedă are o mare putere de penetrație, distrugînd microorganismele hidra-

tate într-un timp mai scurt şi la o temperatură mai joasă decît o poate face căldura uscată.

Acest mod de sterilizare nu are acţiune distructivă asupra unor obiecte, cum ar fi cauciucul, mediile de cultură etc.

a) *Fierberea în apă la 100°*, timp de jumătate de oră, distruge toate formele vegetative şi chiar unele forme microbiene sporulate. Prin adăugare de borax, carbonat de sodiu etc., temperatura de fierbere poate fi ridicată peste 100°. Se foloseşte mai ales la sterilizarea instrumentelor metalice (pense, foarfeci etc.).

b) *Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune la 120°* este cea mai eficace şi se realizează cu ajutorul autoclavului.

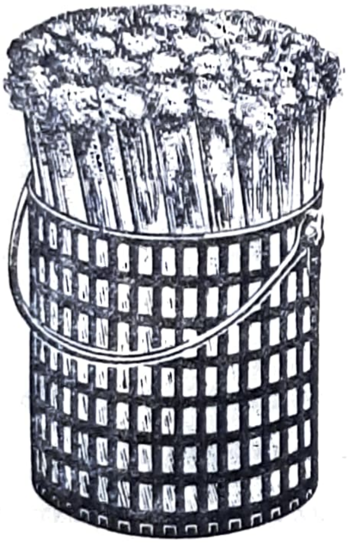


Fig. 228. — Coş metalic cu tuburi cu medii de cultură pregătite pentru sterilizarea la autoclav.

Autoclavul este un aparat format dintr-un cazan cilindric, cu pereţi metalici rezistenţi, prevăzut cu un capac metalic masiv, care se închide etanş printr-o serie de buloane şi prin intermediul unei garnituri de cauciuc sau de azbest. Fiecare autoclav este prevăzut cu un manometru care indică presiunea interioară şi indirect, prin echivalenţă, temperatura: la 1 atmosferă corespund 120° C; un robinet pentru eliminarea aerului din interior şi o supapă de siguranţă. În interior se află un tripied, pe care se aşază un coş metalic cu obiectele pentru sterilizare. Autoclavul este îmbrăcat la exterior de un al doilea înveliş cilindric, de tablă groasă, iar la partea inferioară este situată sursa de căldură (gaze naturale, aragaz etc.).

Se pot steriliza la autoclav, în afară de majoritatea mediilor de cultură şi materiale folosite în practica medicală curentă, cum sînt: instrumente metalice, seringi Luer, seringi cu armătură metalică, obiecte de cauciuc, cîmpuri operatorii, comprese, pansamente, vată etc., precum şi recipiente contaminate, care au servit la cultivarea şi la manipularea microbilor patogeni.

Pentru a putea fi sterilizate şi pentru a-şi păstra această calitate, obiectele enumerate mai sus trebuie pregătite în felul următor:

Mediile de cultură sînt repartizate în recipiente de sticlă (baloane, clondire, sticle, eprubete), ale căror orificii să fie bine astupate cu dopuri de vată în tifon şi apoi acoperite cu hîrtie, care va fi legată cu sfoară.

Instrumentele metalice, precum şi seringile cu armătură metalică se pun în cutii speciale (casolete), care lasă vaporii de apă să pătrundă în interiorul cutiei şi care pot fi apoi închise ermetic. Seringile de sticlă (Luer) se introduc în tuburi de sticlă, care sînt apoi astupate cu dop de vată şi hîrtie. Obiectele de cauciuc, cîmpurile operatorii, pansamente, vată, etc. sînt, de asemenea, aşezate în casolete. Obiectele de

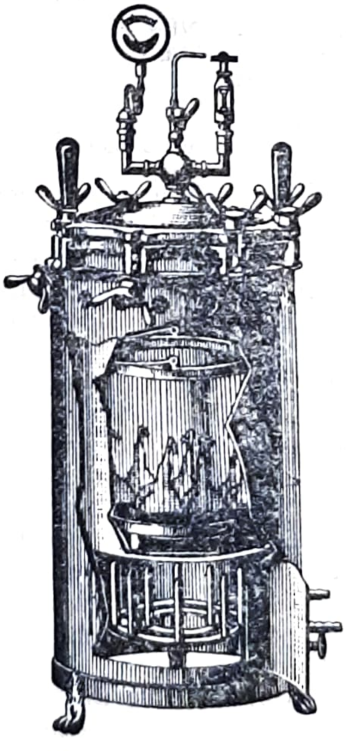


Fig. 229. — Autoclav Chamberland.

cauciuc (dopuri, sonde, etc.) mai pot fi sterilizate şi separat, în recipiente de sticlă în care s-a adăugat puţin ser fiziologic, şi închise apoi cu dop de vată.

Recipientele infectate, care trebuie sterilizate, sînt introduse în găleţi speciale din metal pentru materiale infecte, care se închid cu un capac şi care se sterilizează în autoclav. După sterilizare, materialele şi sticlăria se spală şi se pregătesc pentru o nouă sterilizare şi folosire.

Funcţionarea autoclavului. Materialul de sterilizat se aşază într-un paner de sîrmă sau tablă cu orificii.

Se toarnă apă distilată pînă la marginea superioară a tripiedului şi se aşază panerul pe tripied.

Se închide capacul, strîngînd buloanele diametral opuse; la început toate buloanele se strîng uşor şi în al doilea timp se revine şi se strîng complet. Numai astfel se realizează o închidere etanşe a capacului autoclavului.

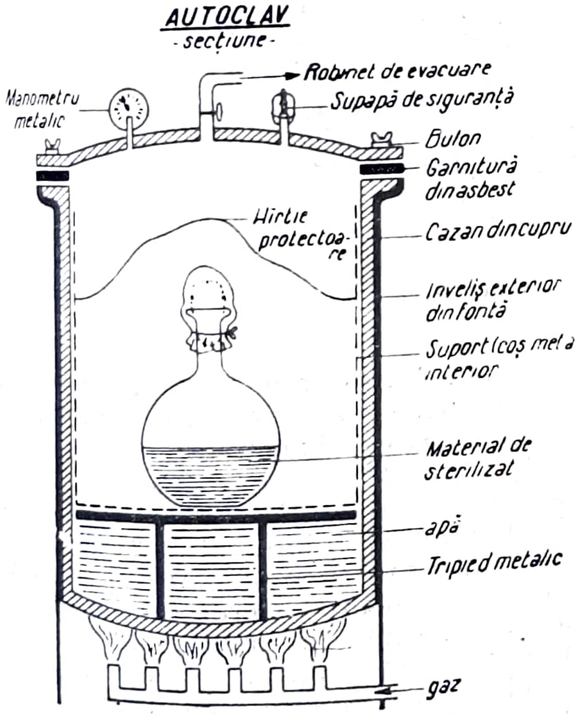


Fig. 230. — Secţiune prin autoclav.

Robinetul de aer se lasă deschis şi se aprinde coroana de becuri de gaz. Se aşteaptă evacuarea completă a aerului din autoclav, care se traduce prin apariţia unui jet continuu de vapori, la robinetul de aer. Se închide robinetul de aer şi se urmăreşte, pe manometru, ridicarea presiunii pînă la 1 atmosferă (1/2 armosferă = 115°; 1 atmosferă = 120°; 2 atmosfere = 134°).

În momentul în care indicatorul manometrului ne arată realizarea presiunii de 1 atmosferă, se micşorează intensitatea sursei de căldură în aşa fel, ca să se menţină o presiune constantă de 1 atmosferă, timp de 30 de minute.

După scurgerea timpului de 30 de minute, necesar sterilizării, sursa de căldură se închide şi se aşteaptă răcirea autoclavului; indicatorul manometrului trebuie să coboare la 0.

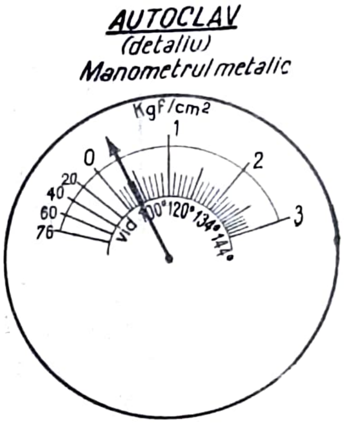


Fig. 231. — Manometrul autoclavului.

Nu este permisă deschiderea robinetului de aer în timp ce presiunea interioară este încă ridicată, deoarece se produce o decompresiune bruscă, urmată de intrarea în ebuliţie a lichidelor din autoclav şi, consecutiv, udarea şi aruncarea dopurilor de vată de la tuburile şi baloanele cu medii. În acest caz, operaţia de sterilizare este greşită şi trebuie reluată.

Controlul sterilizării. Se face prin: teste chimice, fizice şi biologice.

Teste chimice. Întrebuinţarea unor substanţe cu punct de fuziune cunoscut ca: benzonaftolul 110°, sulful 115°, antipirina 114°, acidul benzoic 120°. Dacă se adaugă substanţei cu punctul de topire cunoscut o cantitate mică de colorant pulbere (albastru de metilen, fucsină), invizibil la substanţa în pulbere, ea se colorează în albastru sau roşu în momentul cînd se topeşte. Testele chimice ne ajută să verificăm dacă temperatura sterilizării s-a realizat în interiorul autoclavului. Testele chimice au dezavantajul că ne indică numai nivelul temperaturii din interiorul autoclavului, dar nu şi timpul de acţiune al acestei temperaturi. În practica sterilizării folosim tubuleţe cu floare de sulf şi fucsină pe care le introducem în autoclav cu fiecare lot de obiecte şi materiale supuse sterilizării.

Testele fizice folosesc termometrele înregistratoare cu mercur de 200 sau 300°, care se pot așeza, fie în întregime în interiorul aparatului, fie la interior porțiunea cu rezervorul de mercur și la exterior tubul gradat, pe care se face citirea.

Testele biologice constau în folosirea unor culturi sporulate, care rezistă la temperaturi ridicate (culturi sporulate aerobe, ca bacilul antraxului, rezistent la 115°, bacilul mezenteric sau bacilul stearotermofil, un microb saprofit termofil care rezistă 5 minute la 121° și 1 minut la 130°). Sterilizarea este eficientă dacă însămînțarea sporilor după autoclavare nu este urmată de creșterea bacteriilor. În practică se întrebuințează fire uscate de bumbac sau mătase, îmbibate în prealabil cu cultura sporulată și închise într-un tub de sticlă steril. După sterilizare se sparge tubul și firul de bumbac sau mătase este însămînțat într-un mediu de cultură. Dacă după 48 de ore mediul de cultură rămîne steril, sterilizarea a fost realizată în bune condiții. Testele biologice sînt cele mai eficiente, pentru că ne indică, atît nivelul temperaturii, cît și timpul de acțiune asupra organismului testat.

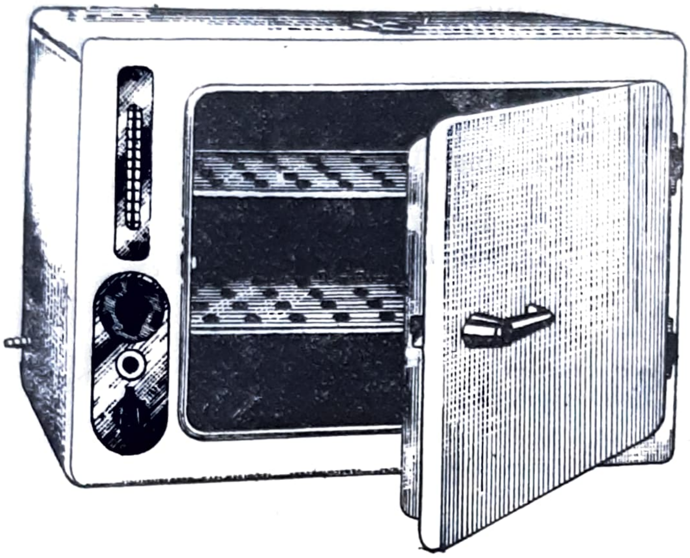


Fig. 232. — Sterilizator electric cu aer cald.

c) *Pasteurizarea* este o sterilizare incompletă, aplicabilă substanțelor lichide în care se realizează numai distrugerea formelor vegetative, nu și a sporilor. Pasteurizarea se poate face la temperatura de 60—65°, timp de 30 de minute; vorbim în acest caz de o *pasteurizare joasă*. Cînd temperatura folosită este de 70—75° timp de 10—20 de minute, se realizează o *pasteurizare medie*.

Cînd lichidele supuse pasteurizării sînt aduse într-un strat subțire în contact cu suprafețe încălzite la 85—90°, timp de cîteva secunde, urmată de o răcire bruscă, se realizează o *pasteurizare înaltă*. Pasteurizarea, și mai ales pasteurizarea înaltă se folosește curent în industria laptelui. Ea are drept scop distrugerea microbilor patogeni din lapte, fără a altera vitaminele și valoarea alimentară.

d) *Tyndallizarea*. Este o pasteurizare repetată și constă în încălzirea de 3 ori, cîte 60 de minute, la interval de 24 de ore, la o temperatură între 60 și 65°. Acest procedeu se întrebuințează pentru sterilizarea mediilor de cultură cu conținut bogat în albumine, care la o temperatură mai ridicată se degradează. Mecanismul sterilizării prin tindalizare se poate explica, pe de o parte, prin hidratarea fracționată a sporilor și deci o posibilitate mai ușoară de coagulare a proteinelor microbiene în cele 3 încălziri succesive, iar pe de altă parte, intervalul de 24 de ore dă posibilitatea formelor sporulate să se transforme în forme vegetative, care sînt mult mai sensibile la acțiunea temperaturii.

2. **Căldura uscată.** *Flambarea* este cea mai simplă metodă de sterilizare prin căldură uscată.

Firul de platină al port-ansei bacteriologice, pipeta Pasteur, lamele, orificiul tuburilor de cultură, în cursul diferitelor manipulări, sînt sterilizate prin flambare în flacăra becului de gaz.

Cuptorul cu aer cald, cuptorul Pasteur sau pupinelul, realizează sterilizarea cea mai eficace prin căldură uscată. Este format dintr-o cutie sau dulap paralelipipedic, cu pereți dubli de tablă, printre care circulă căldura. La partea superioară are un orificiu pentru termometru, la partea inferioară o serie de rezistențe electrice care constituie sursa de căldură.

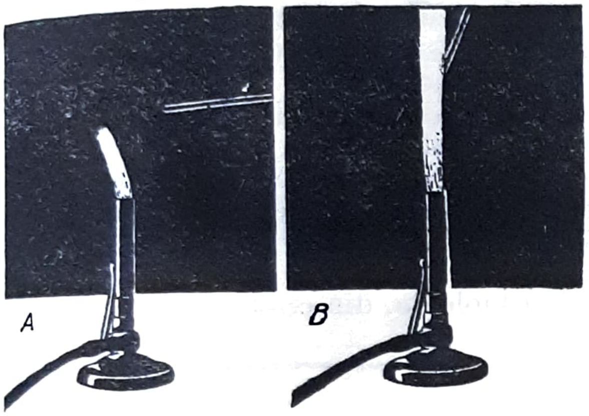


Fig. 233. — Sterilizarea ansei prin flambare.
A — poziție greșită. *B* — poziție corectă.

În cuptorul cu aer cald se sterilizează următoarele materiale : sticlărie de laborator, eprubete, pahare, cutii Petri, pipete, seringi de sticlă Luer, baloane, fiole etc., tampoanele pentru recoltarea produselor patologice, cutiile de instrumente. Obiectele de sterilizat, spălate și perfect uscate, sînt pregătite astfel pentru a le menține sterilitatea : eprubetele, fiolele deschise, baloanele, pipetele Pasteur vor fi astupate cu un dop de vată învelit în tifon, apoi ambalate în hîrtie. Fiolele închise se sterilizează separat, de obicei în cutii metalice. Cristalizoarele, paharele, borcanele vor avea numai un capac de hîrtie legat cu sfoară.

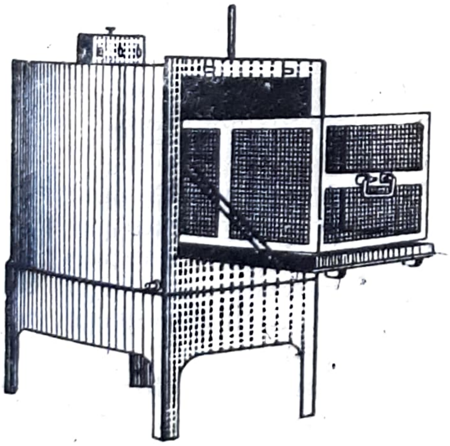


Fig. 234. — Sterilizator cu aer cald (cu gaze).

Plăcile Petri, pipetele gradate, mojarele, pîlniile vor fi învelite complet în hîrtie și legate cu sfoară. Seringile de sticlă sînt așezate în eprubete închise cu dop de vată și învelite în hîrtie. Vata, compresele și pansamentele vor fi de asemenea învelite în hîrtie sau așezate în casolete metalice și apoi sterilizate.

Mod de funcționare. Se așază materialul în cuptor, apoi se face încălzirea cuptorului treptat, pînă cînd temperatura se ridică pînă la 180° și se menține 1 oră. Obiectele nu vor fi scoase din cuptor înainte ca termometrul aparatului să indice temperatura camerei. Deschiderea prematură a ușii cuptorului determină variații bruște de temperatură și duce la crăparea sticlei. Obiectele sterilizate vor fi conservate în dulapuri bine închise.

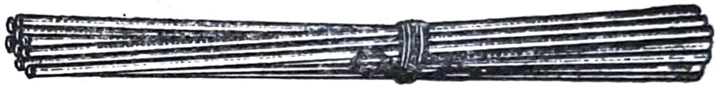


Fig. 235. — Tuburi de sticlă pentru pipeta Pasteur pregătite pentru sterilizare în cuptorul cu aer cald.

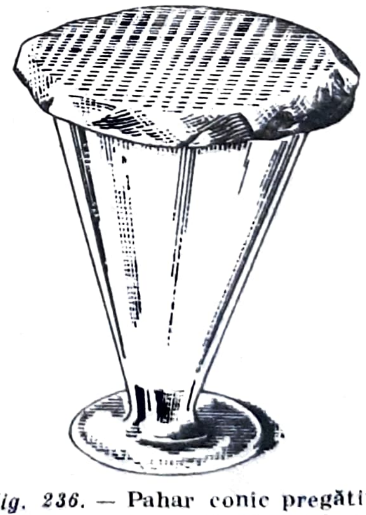


Fig. 236. — Pahar conic pregătit pentru sterilizare în cuptorul cu aer cald.

Controlul unei bune sterilizări la pupinel sau cuptorul Pasteur este realizat de îngălbenirea hîrtiei cu care se împachetează obiectele de sticlă sau îngălbenirea dopurilor de vată cauzată de caramelizarea celulozei. Pentru controlul sterilizării în cuptorul cu aer cald se mai poate folosi testul caramelizării zaharozei la 170°, sub formă de tubușoare de sticlă ce conțin zaharoză, care se așază la diferite niveluri în cuptor.

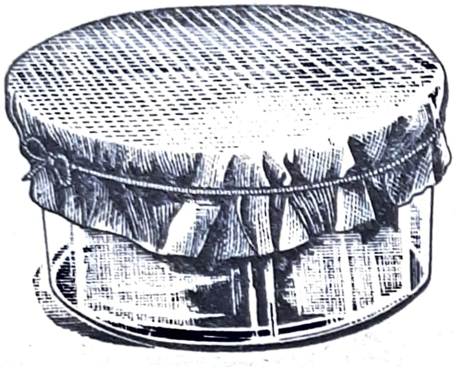


Fig. 237. — Cristalizor pregătit pentru sterilizare în cuptorul cu aer cald.

Cînd zaharoza se topește și devine de culoare brună, avem indicația caramelizării ei și, deci, a realizării temperaturii de 170° în interiorul aparatului de sterilizat.

Depășirea temperaturii obișnuite de sterilizare atrage după sine arderea hîrtiei și a dopurilor de vată, care devin friabile și nu mai pot constitui o garanție a păstrării sterilității. În aceste condiții sterilizarea este ratată și trebuie refăcută.

Cea mai eficientă metodă, valabilă și aci, este folosirea metodei biologice, prin firele de bumbac sau mătase impregnate cu cultură sporulată care ne indică cu precizie eficiența sterilizării.

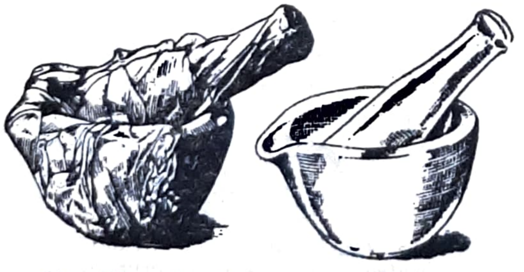


Fig. 238. — Pregătirea unui mojar pentru sterilizare în cuptorul cu aer cald.

Prepararea firelor de bumbac purtătoare de culturi sporulate necesare controlului autoclavelor și sterilizatoarelor cu aer cald: în practica medico-chirurgicală, folosirea ustensilelor și instrumentelor sterile a devenit de o importanță atît de mare, încît se manifestă tendința de înființare în toate spitalele, nu numai în secțiile de chirurgie, a unor servicii centrale de sterilizare a seringilor și instrumentarului, sub îndrumarea și controlul laboratorului.

În asemenea condiții, medicului de laborator îi revine o răspundere deosebită în supravegherea competentă a eficienței unor astfel de servicii. De obicei autoclavele și cuptoarele cu aer cald trebuie supravegheate cu grijă din punct de vedere al eficienței în perioada de început a funcționării unei astfel de instalații. În acest caz se controlează, timp de cîteva zile, fiecare serie de obiecte supuse sterilizării cu ajutorul culturilor sporulate. Dacă eficiența este bună, fără intermitențe, timp de 3—4 zile consecutiv, se consideră instalația stabilizată și se mai controlează biologic, din cînd în cînd, la interval de 7—10 zile, pentru absolută siguranță. De menționat faptul că orice reparație mecanică care se face unui autoclav sau cuptor cu aer cald trebuie urmată de un control riguros și susținut al eficienței sterilizării în aceleași condiții ca la o instalație nouă.

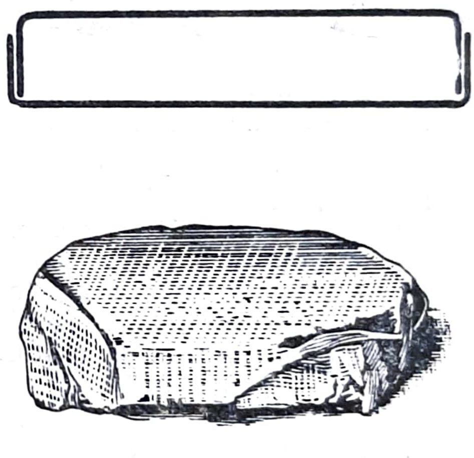


Fig. 239. — Pregătirea unei cutii Petri pentru sterilizarea cu aer cald.

Pentru prepararea firelor de bumbac sau mătase purtătoare de spori cu o bună rezistență termică, se procedează în felul următor: fire de bumbac sau mătase chirurgicală, tăiate în bucăți de 2—3 cm lungime, se așază distanțate între ele într-o cutie Petri, pe o rondelă de hîrtie de filtru, și se sterilizează la autoclav. După sterilizare se ia cu o pensă sterilă cîte o bucată de fir și se însămînțează în 2 tuburi de bulion Brewer aerob și anaerob și se lasă pentru control 3 zile, după care sînt considerate sterile dacă bulionul rămîne limpede.

Pentru realizarea culturii sporulate se folosește o cultură de *B. stearothermophilus* sau *B. mesentericus*, care se cere de la Institutul „Dr. I. Cantacuzino'', Secția culturi microbiene, și se menține în laborator. Se poate folosi și o tulpină de *B. anthracis*, dar este preferabil să se lucreze în laborator cu tulpini lipsite de patogenitate. Tulpina de bacili sporulați aerobi se însămînțează în 2—3 tuburi cu bulion simplu și se incubează la 37°. (Pentru culturile cu *B. stearothermophilus*, incubația se va face la 55°C.) După 24—48 de ore se controlează, prin frotiu colorat cu o metodă de colorație pentru spori (verde malahit sau Pooman), prezența sporilor în număr mare în cultură, apoi se încălzeşte cultura 5 minute la 80°, într-o baie de apă, pentru a distruge formele vegetative; se înmoaie cu ajutorul unei pense sterile, un număr de fire, care apoi se introduc în tubulețe de sticlă de 4—5 cm lungime, sterile și deschise la un capăt. Imediat ce s-a introdus firul de bumbac impregnat în cultura sporulată în interiorul tubului, se închide capătul celălalt al tubului la flacăra unui bec-forjă.

După închiderea tuturor tuburilor se controlează dacă au apărut crăpături la unele din ele în cursul închiderii la flacăra de gaz și se îndepărtează. Aceste tuburi se păstrează în bune condiții timp de luni de zile.

Cînd se face testarea unei sterilizări, se leagă două astfel de tubulețe de unul din obiectele pregătite pentru sterilizare și se introduc în aparat. După scurgerea timpului de sterilizare tuburile se iau în laborator, se deschid la flacără cu ajutorul unei pile de fiole și se însămînțează într-un tub de bulion aerob și unul anaerob. Din aceeași serie de tubulețe se însămînțează în bulion aerob și unul neutilizat, pentru a avea un martor al bunei conservări a sporilor. După 3 zile de incubație la termostat, dacă în culturile-test aerobe și anaerobe bulionul rămîne limpede și în tubul martor se tulbură, în urma germinării sporilor și transformărilor în formă vegetativă, aparatul de sterilizare funcționează normal, iar metoda biologică de control folosită este eficientă.

Socotim necesar să atragem atenția că prin păstrarea îndelungată a tulpinilor sporulate în laborator, rezistența termică a sporilor scade treptat. Acest lucru ar putea să determine apariția unor erori în aprecierea eficienței metodelor de sterilizare. De aceea este util ca, la interval de 3—4 luni de păstrare a unei tulpini în laborator, să se controleze rezistența termică a culturii sporulate. Aceasta se face prin încălzirea culturii timp de minimum 6 ore într-o baie de apă la fierbere. Dacă rezistența termică a culturii este bună, după acest interval însămînțările în bulion trebuie să fie pozitive. În caz contrar, trebuie schimbată tulpina sau să ne izolăm singuri tulpini de bacili sporulați din sol.

B. FILTRAREA

Gazele și lichidele pot fi debarasate de microorganisme trecîndu-le printr-o substanță poroasă, care reține microorganismele. Filtrarea este indicată de obicei pentru lichidele care conțin substanțe alterabile prin căldură, cum ar fi toxinele microbiene, lichidele biologice și unele medii de cultură lichide.

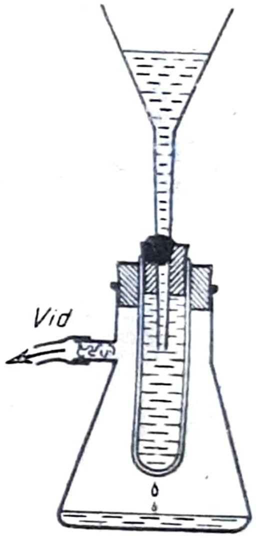


Fig. 240. — Filtru tip Kitasato cu bujie Chamberland.

Filtrele folosite pot fi de mai multe feluri:

a) filtrele Chamberland, făcute din porțelan ars; *b*) filtrele Berkefeld, făcute din pămînt de infuzorii; acestea, ca și cele Chamberland, se mai numesc și bujii sau lumînări, după forma pe care o au. Ambele categorii de filtre arătate mai sus pot fi recondiționate după folosire;

c) filtrele Seitz, formate dintr-o armătură metalică, pe care se fixează o membrană dintr-un amestec de celuloză cu azbest, prin care se face filtrarea propriu-zisă; acestea sînt filtrele folosite cel mai des în practică; membrana de azbest nu mai poate fi recondiționată după folosire, ci se aruncă;

d) filtrele Schott, din spumă de sticlă (*verre fritté*), deosebit de fragile, se folosesc la filtrarea lichidelor cristaline, cu molecule mici.

Toate aceste filtre au pori de dimensiuni variabile, lăsînd să treacă particule de mărimi diferite. Filtrele Chamberland sînt de 7 dimensiuni, notate de la L_1 la L_7 (L_7 avînd porii cei mai fini); filtrele Berkefeld sînt de 3 dimensiuni V, N și W (V = Viel; N = Normal; W = Wenig), în ordinea descreșterii porilor; filtrele Seitz sînt de 4 mărimi EKS, EKS_1, EKS_2, EKS_3; filtrele Schott sînt de 5 mărimi notate G_1 — G_5.

Toate aceste filtre rețin microbii, lăsînd să treacă lichidul steril. Ele nu pot reține însă majoritatea virusurilor. Pentru a reține virusurile, se folosesc membrane de colodiu cu porozităţi foarte fine, numite ultrafiltre.

Operaţia filtrării se face prin aspiraţie în mod obişnuit, mai rar şi prin compresiune. Filtrarea nu trebuie să se prelungească mult timp, deoarece unele forme microbiene mici pot totuşi forţa porii filtrului, într-un timp mai îndelungat, sterilitatea nemaifiind astfel asigurată.

În filtrare, adsorbţia şi presiunea sau depresiunea joacă rolul principal; dar această operaţie mai este influenţată de tensiunea superficială a lichidului, de încărcătura electrică a filtratului şi a corpilor microbieni în raport cu filtrul.

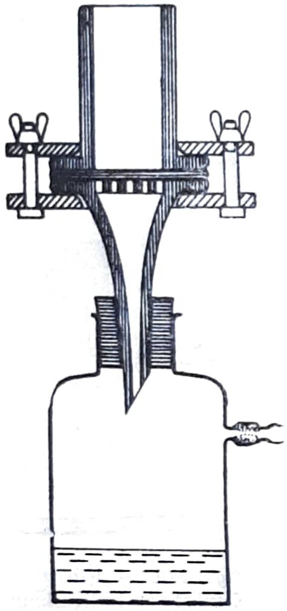


Fig. 241. — Dispozitiv de filtrare prin placă filtrantă tip Seitz.

Temperatura filtratului, precum şi pH al lichidului de filtrat (dacă este alcalin, filtrarea se face mai repede), influenţează favorabil sau defavorabil operaţia de filtrare.

Sistemul de filtrare cu filtre Seitz este cel mai frecvent folosit în practica de laborator. Întrebuinţarea membranelor filtrante Seitz se face prin montarea lor în armătura din metal argintat şi aşezarea, prin intermediul unui dop de cauciuc, pe un balon Kitasato special, cu pereţi de sticlă groasă, Jena sau Pyrex. Înainte de filtrare, filtrele Seitz, montate pe balonul Kitasato, sînt bine spălate şi sterilizate în autoclav. Aparatul de filtrare Seitz este de 2 tipuri : a) pentru filtrarea prin aspiraţie, în care aparatul se compune dintr-o pîlnie metalică de formă cilindrică, prevăzută la partea inferioară cu o rondelă de sită, peste care se aşază un disc din membrane de azbest. Membrana filtrantă din azbest este fixată etanş de pîlnie, prin 3—6 şuruburi laterale care se înşurubează strîns. În interiorul pîlniei se toarnă lichidul de filtrat, iar prin tubul lateral al balonului Kitasato se face aspiraţie cu ajutorul unei pompe de vid; b) pentru filtrarea cu presiune pozitivă sau compresiune, partea superioară a pîlniei cilindrice este complet închisă cu un capac metalic etanş, care este prevăzut cu 2 robinete. Prin unul din robinete se toarnă o parte din lichidul de filtrat în pîlnie şi apoi se închide robinetul. Apoi se deschide robinetul al doilea şi se adaptează o pompă de presiune pozitivă, asemănătoare unei pompe de automobil. Este preferabil să se folosească, pentru crearea presiunii pozitive, o bombă cu azot (gaz inert steril), care prin intermediul unui dispozitiv reductor de presiune reglabil să realizeze 0,3 sau maximum 0,5 atmosfere în filtru. Precauţiile necesare desfăşurării în bune condiţii a filtrării sînt următoarele :

— Durata filtrării să nu fie prea mare, iar compresiunea sau aspiraţia să fie moderate. În mod obişnuit, o presiune constantă, de 20 cm Hg, cu o durată a filtrării de 30 de minute, asigură sterilitatea lichidului filtrat.

— Pentru a evita colmatarea rapidă a membranei filtrante, lichidele organice vor fi diluate în prealabil în ser fiziologic. Suspensiile din organe după triturarea fragmentelor în mojar cu nisip steril, vor fi în prealabil degrosisate prin centrifugare, 10—15 minute la 3 000 turaţii pe minut, filtrate prin hîrtie de filtru şi apoi diluate.

— Variaţiile bruşte de presiune sau depresiune în timpul operaţiei de filtrare trebuie evitate, pentru că determină o colmatare a porilor membranei filtrante şi o scădere sau oprire a debitului de filtrare.

— Orice filtrat trebuie controlat pentru sterilitate prin însămînţări pe medii de cultură aerobe şi anaerobe, care trebuie să rămînă sterile după o incubaţie de 48 de ore la 37°.

C. ENERGIA RADIANTĂ

Unele radiaţii din spectrul solar, cu anumită lungime de undă, au o acţiune bactericidă. Cele mai întrebuinţate sînt razele ultraviolete. Ca surse artificiale de raze ultraviolete se folosesc lămpile cu vapori de mercur. Razele ultraviolete sterilizează numai corpuri transparente şi au o penetrabilitate redusă. Se folosesc la sterilizarea aerului încăperilor, a aerului boxelor pentru lucru steril, a serurilor, a unor medii de cultură, a apei de băut etc. Acţiunea lor bactericidă se limitează numai asupra formelor vegetative ale microbilor. Razele X şi radiaţiile elementelor radioactive au o acţiune complexă asupra bacteriilor, dar în general inhibează creşterea microbilor.

D. VIBRAŢIILE (UNDELE) ULTRASONICE SAU SUPERSONICE

Sînt vibraţii acustice, a căror frecvenţă depăşeşte cu mult limitele percepţiei noastre auditive. Acest gen de vibraţii se obţin în aparate speciale, care permit trecerea unui curent alternativ de înaltă frecvenţă printr-un cristal de cuarţ. Vibraţiile masei cristalului de cuarţ, sub acţiunea impulsurilor electrice, au o intensitate de peste 20 de Khz/secundă, ceea ce duce la dezintegrarea rapidă a celulelor bacteriene.

II. ANTISEPSIE ŞI DEZINFECŢIE

Unele substanţe chimice cu acţiune antimicrobiană sînt utilizate, fie în doze moderate, pentru a împiedica dezvoltarea bacteriilor într-un mediu de cultură sau într-un lichid biologic pe care dorim să-l păstrăm la adăpost de contaminarea cu microbi, fie în doze mari, cînd urmărim distrugerea completă a tuturor bacteriilor.

În primul caz se vorbeşte de acţiune bacteriostatică în cel de-al doilea, de acţiune bactericidă.

Substanţele chimice antimicrobiene mai posedă o proprietate importantă, aceea a acţiunii selective. Aceeaşi substanţă poate acţiona bactericid asupra unei specii microbiene, bacteriostatic faţă de altă specie, şi indiferent faţă de o a treia specie microbiană. Este necesar însă să facem aici deosebirea între substanţele chimice cu acţiune antimicrobiană în afara organismului, şi pe care le denumim obişnuit antiseptice sau dezinfectante şi substanţele antimicrobiene folosite în tratamentul bolilor infecţioase, care poartă denumirea de chimioterapice.

În laboratoarele de microbiologie şi în spitalele de boli transmisibile, dezinfectantele sînt curent folosite pentru distrugerea bacteriilor de pe mîini, mesele de lucru, duşumele, de pe partea metalică a patului bolnavului, de pe cuştile animalelor şi pentru produsele patologice. Pentru conservarea lichidelor organice ca ser, sînge, urină şi a produselor biologice, seruri şi vaccinuri, se folosesc substanţe chimice volatile, ca toluol, cloroform şi altele ca formol, fenol, mertiolat etc.

În compoziţia mediilor de cultură selective sînt înglobate substanţe antiseptice, ca verde de briliant, cristal violet, roşu de Congo sau verde malahit, care, prin acţiunea lor selectivă, inhibează creşterea unor specii microbiene, favorizînd dezvoltarea altora.

Principalele substanţe chimice antiseptice şi dezinfectante folosite în microbiologie sînt :

— Acidul sulfuric, acidul acetic, acidul boric, acidul clorhidric etc., primul utilizîndu-se mai ales sub formă de amestec sulfocromic pentru spălarea şi dezinfecţia sticlăriei de laborator.

— Compuşi halogenaţi : tinctura de iod, cloramina în soluţie apoasă 1% pentru mîini, cloramina în soluţie concentrată de 5–6% pentru mesele de laborator, cuşti de animale şi produse patologice, ca spute şi materii fecale.

— Compuşi oxidanţi : apa oxigenată 5%, permanganat de K 1‰ sau clorat de K pentru dezinfecţia mucoaselor.

— Alcoolul, sub forma de alcool etilic 70%, este folosit la dezinfecţia mîinilor.

— Formolul, sub forma de soluţie apoasă 5% din soluţia comercială de aldehidă formică 40%.

— Fenolul şi crezolii cu derivaţii lor, în special creolina, se folosesc în concentraţii de 5% pentru dezinfecţia lenjeriei de spital înainte de spălare şi în concentraţie de 10% pentru spute şi materiile fecale.

METODA CONTROLULUI STERILITĂŢII APEI ÎN INSTALAŢIILE SERVICIILOR DE CHIRURGIE

Periodic este prudent ca laboratorul să controleze preventiv sterilitatea apei din instalaţiile de apă sterilă ale sălilor de intervenţii chirurgicale. Acest lucru este obligatoriu dacă între timp s-au efectuat unele reparaţii ale instalaţiei.

Materialul necesar : sticle de 100–150 ml cu dop rodat, sterilizate în autoclav cu dop de vată şi tifon lat, dopul de sticlă ambalat separat şi legat de gîtul sticlei. O lampă de spirt pentru flambarea robinetelor, un creion dermograf, etichete şi o casoletă pentru transportul probelor la laborator.

Tehnica recoltării probelor de apă

Cu ajutorul creionului dermografic se numerotează robinetele prin care se distribuie apă sterilă, 1, 2, 3, 4 etc. Se flambează cu ajutorul lămpii de spirt gura robinetului timp de 1–2 minute, apoi se deschide robinetul, se lasă să curgă apa 1 minut, apoi se recoltează în sticlă 60–80 ml apă. Pentru a asigura condiţiile de asepsie necesare recoltării corecte, deschiderea şi închiderea sticlei de recoltă se vor face la adăpostul flăcării lămpii de spirt. Pe sticla de recoltă se lipeşte o etichetă, care să cuprindă numărul robinetului, data şi ora recoltării şi eventual alte date care caracterizează funcționalitatea instalației (de exemplu : robinet defect). Probele de apă se aduc în laborator. În situația cînd probele trebuie transportate, recoltele se vor menține la gheață sub +4°, timp de maximum 6 ore de la recoltare.

Tehnica însămînțării apei

Proba de apă recoltată de la fiecare robinet al instalației se însămînțează pentru floră aerobă și anaerobă după cum urmează :

A. Insămînțări pentru flora aerobă :

— în 5 tuburi cu bulion glucozat 1% sau bulion simplu, cîte 0,1 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml și 5 ml, din apa de cercetat;

— în profunzime, 5 plăci Petri cu geloză — sînge. Întîi se notează pe fiecare din cele 5 plăci cu creionul dermograf numărul probei și cantitatea de apă care se însămînțează : 0,1 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml și 5 ml. Se repartizează apoi cu pipete gradate sterile cantitățile din apa de cercetat și în sfîrșit se toarnă în fiecare placă 8—10 ml, din amestecul topit și răcit la 45° din geloză cu sînge defibrinat 10%.

B. Insămînțările pentru flora anaerobă :

— în 5 tuburi cu bulion Brewer pentru anaerobi sau în lipsă, bulion glucozat anaerob, care se regenerează înaintea întrebuințării ; se însămînțează cîte 0,1 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml și 5 ml din apa de cercetat.

Mediile însămînțate se incubează la termostat, la 37°, și se controlează după 24 de ore pentru turbiditate și prezența coloniilor microbiene. În cazul cînd s-au dezvoltat colonii microbiene, se vor efectua subculturi în bulion și geloză înclinată în vederea studierii și identificării tulpinii.

Dacă după 24 de ore mediile însămînțate au rămas sterile se continuă termostatarea încă 4 zile și se continuă zilnic observația. După 5 zile de termostatare, dacă mediile au rămas sterile, se eliberează buletinul de analiză, care certifică sterilitatea apei cercetate.

BIBLIOGRAFIE

GASTINEL P. — Précis de bacteriologie médicale, Ediția a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 190—191.

HALLMANN L. — Bakteriologie und serologie, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 613—620.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approved laboratory tehniques, Ed. Appleton Century, Crofts, New-York, 1945, p. 323—325.

KOROVIN F. T., NUZDHIN I. D., FILIPENKO A. I. — Dezinfecția ca mijloc de protecție antibacteriană, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1959, nr. 6, p. 40—44.

POSZGI N. — Bacteriologie medicală (sub redacția prof. N. Nestorescu și colab.), Ed. medicală, București, 1961, p. 116—128.

POPOVICI MARCELA — Bacteriologie medicală (sub redacția prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, București, 1961, p. 206—214.

WHITBY L., HYNES M. — Medical Bacteriology, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 9—22.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, 1959, G. Thieme, Leipzig, p. 160 — 183.

METODE DE CULTIVARE A MICROBILOR

MEDIILE DE CULTURĂ

Metodele necesare cultivării microbilor patogeni trebuie să asigure acestora condiții de dezvoltare cît mai apropiate de cele întîlnite în organismul uman parazitat. De aceea ele trebuie să îndeplinească anumite condiții pentru ca specia microbiană cultivată să se poată dezvolta :

— să conțină substanțele nutritive necesare dezvoltării speciei microbiene însămînțate ;

— să aibă gradul de alcalinitate sau aciditate favorabil dezvoltării microbilor ; obișnuit, pH este de 7,2—7,4 pentru microbii patogeni ;

— să asigure condițiile de aerobioză sau anaerobioză ;

— să fie conținute în recipiente care să împiedice contaminarea culturii microbiene care se dezvoltă în ele, înainte și după însămînțare (sterile) ;

— să asigure un anumit grad de umiditate și adăpost de lumină.

Creșterea și multiplicarea maximă a microbilor patogeni are loc la un optim de temperatură, obișnuit, în jurul a 37°, pentru bacteriile patogene.

Mediile de cultură oferă hrana necesară dezvoltării și multiplicării microbilor. Ele constituie substratul energetic necesar tuturor funcțiilor metabolice ale celulei bacteriene.

Mediile de cultură întrebuințate în bacteriologie pot fi împărțite în două categorii : medii de cultură uzuale sau obișnuite, pe care se dezvoltă cea mai mare parte a germenilor patogeni, și medii speciale sau complexe, utilizate pentru anumite specii microbiene.

Din punctul de vedere al aspectului fizic, mediile de cultură sînt : lichide, solide şi semisolide.

Ca procedeu general, prepararea mediilor de cultură uzuale se realizează trecînd prin următoarele etape :

1. *Stabilirea compoziţiei mediului.* În această operaţie se dizolvă în apă, la cald, ingredientele de bază care reprezintă substratul nutritiv, după indicaţiile formulei de preparare.

2. *Corectarea pH.* Se realizează prin adăugarea unei cantităţi de hidrat de Na soluţie 1/10 la cantitatea totală de macerat pentru neutralizarea amestecului şi apoi se corectează cu ajutorul metodei colorimetrice sau electrometrice la pH dorit.

3. ***Precipitarea***, care se realizează prin autoclavarea maceratului de carne timp de 10—15 minute la 120°, operaţie care realizează depunerea tuturor substanţelor precipitabile şi în special a fosfaţilor alcalino-teroşi şi determină clarificarea amestecului.

4. ***Filtrarea*** se realizează, obişnuit, prin trecerea lichidului fierbinte prin hîrtie de filtru sau vată şi are de scop înlăturarea precipitatelor şi grăsimilor din amestec.

5. ***Repartizarea*** în recipiente sterile, tuburi sau baloane, închise cu dop de vată. Se ia precauţia de a nu umple cu mediu decît 1/3 din volumul recipientului.

6. ***Sterilizarea*** prin autoclavare, 20—30 de minute la 115—120°. Trebuie să ţinem totdeauna seama de precauţia de a nu efectua sterilizarea la o temperatură superioară precipitării. Recipientele care după sterilizare au dopurile umede sînt eliminate.

Mediile sterile se pot păstra timp de cîteva săptămîni la temperatura de +4°. Este util ca înainte de a folosi medii păstrate un număr de zile, să le recontrolăm gradul de umiditate şi sterilitatea prin termostatare 24 de ore la 37°.

I. PREPARAREA MEDIILOR UZUALE LICHIDE

Bulionul de carne şi apă peptonată

Bulionul de carne reprezintă mediul de bază în microbiologie. Prepararea lui se realizează în două etape succesive, prepararea maceratului de carne şi apoi a bulionului propriu-zis.

Maceratul. Carne slabă de vacă sau de cal, se curăţă de oase, tendoane, aponevroze şi grăsime, se toacă şi se macerează la rece în cantitate de 500 g la 1 000 ml apă de robinet, timp de 12—24 de ore. În acest interval de timp se realizează autoliza ţesuturilor şi solubilizarea produselor de autoliză în apă. Se fierbe apoi timp de 10 minute maceratul, pentru a accentua dizolvarea substanţelor solubile şi a coagula albuminele insolubile.

După răcire se stoarce amestecul printr-o bucată de pînză groasă sau tifon dublu. Se filtrează apoi prin hîrtie de filtru sau vată, pentru a opri grăsimile care, sub această formă, nu pot fi utilizate de bacterii. Se repartizează apoi zeama de carne, astfel obţinută, în baloane sau flacoane mari, spălate şi sterilizate, care se închid cu dopuri de vată îmbrăcate în tifon. Se sterilizează 30 de minute la 120°. Aceasta constituie maceratul de carne, care se poate păstra steril la rece, timp îndelungat şi constituie substanţa de bază pentru pregătirea mediilor lichide şi solide.

Procedeul în care autoclavarea maceratului de carne se face la 2 atmosfere, 134° în loc de 120°, poate fi folosit pentru a produce un bulion cu calităţi nutritive superioare, deoarece protidele din carne sînt degradate într-o proporţie mai mare, pînă la stadiul de peptone şi aminoacizi, devenind sub această formă mai accesibile metabolismului bacteriilor.

Bulionul: la 1 000 ml macerat se adaugă , la cald, 10 g peptonă şi 5 g clorură de Na, se amestecă totul într-o oală smălţuită şi se încălzeşte în continuare, pînă la dizolvarea completă a peptonei. Se lasă să se răcească, apoi se determină pH după metoda colorimetrică, cu comparatorul Walpole sau Hellige, şi se corectează cu hidrat de Na 10% pînă la pH 7,8.

După corectarea pH, mediul se repartizează într-un balon de 2 litri, care se autoclavează 15 minute la 120°, pentru precipitarea sărurilor alcalino-teroase. Pentru îndepărtarea precipitatului şi resturilor de grăsimi se filtrează prin hîrtie de filtru, iar apoi se repartizează steril cu pipeta sau, preferabil, cu ajutorul unui aparat de repartizare, în balonaşe şi eprubete sterile, care se închid cu dopuri de vată ; apoi se sterilizează 20 de minute la 115°.

Apa peptonată. În 1 000 ml apă distilată se dizolvă, la cald, 10—20 g de peptonă şi 5 g de clorură de Na. Se corectează pH la 7,8, se filtrează prin hîrtie de filtru, se repartizează în tuburi şi se sterilizează 30 de minute la 120°.

Peptonele întrebuinţate în microbiologie sînt substanţe care rezultă din digestia peptică a cărnii. Ele au o compoziţie complexă şi conţin printre altele, albumoze, polipeptide și peptone, deosebit de necesare metabolismului bacterian. Compoziția lor variază după țesutul și specia animală care servește drept materie primă. O proprietate importantă este faptul că în soluție nu coagulează la căldură.

II. MEDII UZUALE SOLIDE ȘI SEMISOLIDE

Izolarea bacteriilor patogene dintr-un produs patologic cu ajutorul mediilor lichide este laborioasă și uneori imposibilă. Această izolare este mult ușurată prin întrebuințarea mediilor solide, introduse în tehnica microbiologică de Robert Koch.

Geloză sau bulion-agar

Sub acest nume se înțelege bulionul obișnuit, modificat prin adăugare de geloză sau agar-agar (o algă din India).

Se macerează în apă rece, timp de 6—12 ore, 20 g de agar-agar, schimbînd apa de cîteva ori. Geloza astfel muiată și spălată se stoarce de apă într-o cîrpă curată și uscată și apoi se adaugă la 1 000 ml de bulion încălzit. Se încălzește în continuare și se amestecă cu o baghetă de sticlă, pînă la topirea completă. Se determină pH și se corectează, pentru a avea pH final de 7,2. Se autoclavează 20 de minute la 120°. Se filtrează prin hîrtie de filtru la cald, eventual în autoclavul deschis, și se repartizează în tuburi sterile. Se sterilizează 20 de minute la 115°. Dacă dorim să obținem o geloză foarte limpede, se diluează un albuș de ou în 100 ml apă distilată și se amestecă bine cu geloza, după corectarea pH și înainte de autoclavarea pentru precipitare. Geloza nutritivă este transparentă, de culoare gălbuie, se solidifică la temperatura de 40°, se lichefiază la cald. Este folosită sub formă de geloză înclinată în tuburi sau turnată în plăci Petri.

Gelatina

Se cîntăresc 120—150 g de gelatină în foi, care apoi se fragmentează. Se încălzește la 80° un litru de bulion și se adaugă gelatina, amestecînd pînă la topire. Cînd gelatina este complet topită (nu trebuie să se depășească temperatura de 80°), se alcalinizează net cu hidrat de Na 10%, apoi se lasă să se răcească la 55°. În acest moment se adaugă un albuș de ou dizolvat în 10—20 ml de apă distilată și se agită puternic amestecul. Se autoclavează apoi 30 de minute la 115° pentru precipitarea fosfaților alcalino-teroși. Se filtrează apoi prin hîrtie de filtru și se repartizează în tuburi. Se sterilizează 20 de minute la 110° și se lasă să se răcească în poziție verticală.

Este menționat că stadiul de alcalinizare este deosebit de important pentru reușita mediului. Dacă alcalinizarea este prea intensă, gelatina nu face priză; dacă este prea slabă, mediul se tulbură. Mai este bine de știut că, în funcție de anotimp, se utilizează iarna o gelatină 10%, iar vara 15%. Gelatina lichefiindu-se sub 22°, nu poate fi așezată în termostatul de 37°, ci în termostatul special de gelatină la 22 ° sau, în lipsa lui, la temperatura camerei. Acest mediu permite diferențierea microbilor proteolitici care lichefiază gelatina, de cei care nu o lichefiază.

Cartoful

Cartoful bine spălat se taie cu un cuțit special în fragmente cilindrice, care se desfac în 2 semicilindri. Feliile se țin în carbonat de sodiu 1/500, timp de 2 ore, apoi se storc și se usucă într-o cîrpă curată. Se repartizează în tuburi speciale Roux, care conțin la fund, pînă la partea gîtuită a tubului, ser fiziologic, bulion sau apă glicerinată, astfel ca extremitatea inferioară a feliei de cartof să fie ușor cufundată în lichid. Se sterilizează 30 de minute la 120°.

Cartoful este utilizat ca mediu de cultură pentru studiul pigmentogenezei unor microbi, ca de pildă stafilococul, dar mai ales pentru întreținerea în laborator, a culturilor de micobacterii ca tulpina B.C.G.

III. MEDIILE SEMISOLIDE

Sînt medii obișnuite, în care conținutul în agar-agar este scăzut la 0,5% ceea ce le conferă o consistență semifluidă. Se întrebuințează ca medii de izolare în tuburi Weinberg în tehnica culturilor pentru bacteriile anaerobe, sau pentru cultivarea stafilococului producător de toxină.

DETERMINAREA pH

După cum s-a mai arătat la începutul capitolului, mediile de cultură, pe lîngă conținutul în substanțe nutritive indispensabile dezvoltării microbilor (apă, săruri, surse de carbon și azot), au nevoie de un anumit grad de alcalinitate sau aciditate, care să favorizeze dezvoltarea bacteriilor însămînțate.

Pentru definirea gradului de alcalinitate au de aciditate a unei soluții se folosește simbolul

„pH", care reprezintă logaritmul cu semn schimbat al concentrației ionilor de H^+ din soluția dată;

$$pH = -\log cH.$$

La această constatare s-a ajuns în felul următor:

Dintre toți compușii chimici, numai apa (H_2O), prin disociere, dă naștere, atît la ioni H^+ (caracteristici acizilor), cît și la ioni OH^- (caracteristici bazelor). Prin această proprietate reacția ei este totdeauna neutră, ionii H^+ neutralizînd pe cei OH^-. Disocierea apei este extrem de mică; din 100 000 000 000 000 de molecule de H_2O, numai 1 moleculă este disociată. Matematic, putem exprima mai simplu acest lucru, și anume: $\frac{1}{14}$ este constanta de disociere a apei.

Ionii OH^- și ionii H^+ fiind în cantitate egală, concentrația fiecăruia în parte poate fi reprezentată de valoarea $\frac{1}{10^7}$ sau, ceea ce este același lucru, 1×10^{-7}.

S-a convenit, în mod arbitrar, că aciditatea sau alcalinitatea reală să fie reprezentată prin exponentul lui 10 cu semn schimbat, în cazul nostru „cifra 7", iar acest exponent a fost numit pH. Matematic vorbind, pH este logaritmul cu semn schimbat al expresiunii 1×10^{-7}, care arată concentrația ionilor de hidrogen. Deci, pH al unei soluții exprimă concentrația ionilor de hidrogen prezenți în soluție.

Acizii și bazele intervin în procesele biologice numai prin acele molecule care se găsesc disociate în soluții apoase; pH ne indică această stare de disociere. Se știe că un acid se disociază totdeauna într-un ion H^+ (electropozitiv) și un radical R^- (electronegativ) variabil după acidul întrebuințat. Astfel:

Acid acetic (CH_3COOH) $CH_3COO^- + H^+$
Acid clorhidric (HCl) $Cl^- + H^+$ etc.

iar bazele, prin disociere electrolitică, dau un ion de OH^- (electronegativ) și un radical R^+ (electropozitiv). Astfel:

Hidratul de Na ($NaOH$) $Na^+ + OH^-$
Hidratul de amoniu (NH_4OH) $NH_4^+ + OH^-$ etc.

Se numesc acizi tari (acidul clorhidric, sulfuric) sau baze tari (hidratul de Na, hidratul de K) acizii și bazele care în soluții apoase au totalitatea sau majoritatea moleculelor disociate, pe cînd bazele și acizii slabi au un mare procent de molecule nedisociate (acidul acetic, acidul citric, hidratul de amoniu). Moleculele de acizi sau baze disociate formează ceea ce numim aciditatea sau alcalinitatea reală sau actuală (exprimată prin pH), iar moleculele nedisociate reprezintă aciditatea sau alcalinitatea potențială; suma lor reprezintă aciditatea sau alcalinitatea totală. Există anumite formule care ne dau posibilitatea de a calcula concentrația ionilor de OH^-, cunoscînd numai valoarea concentrației ionilor H^+, și invers. Practic, însă, s-a stabilit o scară convențională de pH de la 0 la 14, în care neutralitatea este reprezentată prin pH 7.

Neutralitate

$$pH \underset{\text{tare}\qquad\qquad\qquad\text{slabă}}{\overset{0\ 1\ 2\ 3\ 4\ 5\ 6}{\overline{\qquad\qquad\qquad\qquad}}}\ 7\ \underset{\text{slabă}\qquad\qquad\qquad\qquad\text{tare}}{\overset{8\ \ 9\ \ 10\ \ 11\ \ 12\ \ 13}{\overline{\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad}}}\ 14$$

aciditate alcalinitate

pH 0 = aciditate absolută, corespunde unei soluții care ar cuprinde un ion-gram H^+ la litru, fără nici un oxidril;
pH 1 = o soluție de 10 ori mai slabă (1/10 ioni-g H^+ la litru);
pH 2 = o soluție de 100 ori mai slabă (1/100 ioni-g H^+ la litru);
pH 14 = alcalinitate absolută (conține 1 ion-g H^+ la litru);
pH 13 = o soluție de 10 ori mai slabă (conține 1/10 ioni-g OH^- la litru).

Sisteme tampon. Viața oricărei celule, deci și a bacteriilor nu este posibilă decît în limite foarte restrînse ale pH. Creșterea acidității sau alcalinității mediului peste limitele specifice ale celulei reprezintă o cauză de tulburare a metabolismului, care poate duce pînă la moartea celulei. Organismele pluricelulare realizează menținerea pH în limite constante necesare vieții, prin intermediul unor substanțe care pot să elibereze, după nevoile momentului, fie ioni H^+, fie ioni OH^-.

Aceste substanțe alcătuiesc sistemele tampon. În mediile de cultură, sistemele tampon se realizează în parte din extractele de organe și țesuturi care se găsesc în compoziția mediilor obișnuite și prin adăugarea în mediu a unor substanțe chimice, cum sînt de pildă fosfații.

Determinarea pH al mediilor de cultură se face, fie cu ajutorul metodelor electrometrice, foarte precise, care însă necesită aparate speciale, fie prin metode colorimetrice, care sînt mai puțin precise, nu necesită instalații deosebite și sînt satisfăcătoare pentru lucrările curente de laborator.

Metodele electrometrice se bazează pe faptul că orice soluție în care există substanțe disociate în ioni, se caracterizează printr-un anumit potențial electric, proporțional cu pH al soluției. Determinarea acestui potențial permite deci cunoașterea pH al soluției date.

Aparatele electrometrice (potențiometre) sînt prevăzute cu doi electrozi, unul indicator (de obicei din platină), și altul de compensație (cu calomel). Cei doi electrozi se introduc în soluția al cărei pH trebuie determinat, iar modificarea diferenței de potențial create între electrodul indicator și cel de compensație se apreciază, fie cu un voltmetru electronic, fie prin metoda compensației.

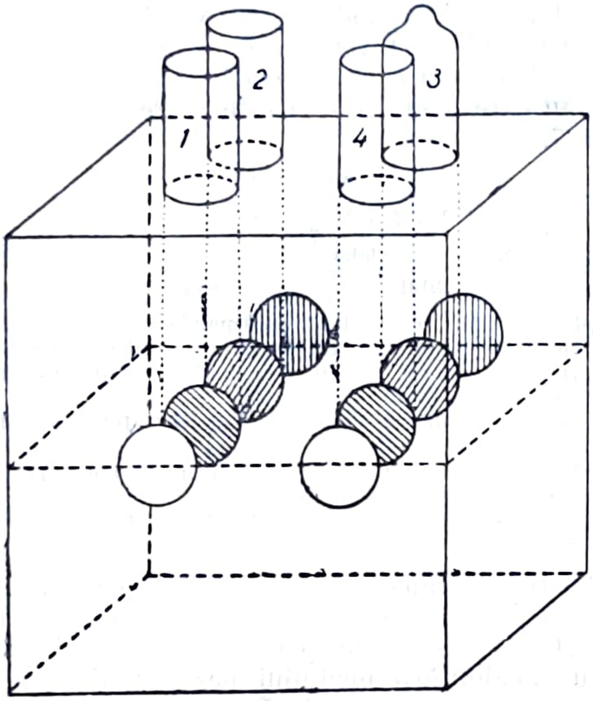


Fig. 242. — Schema comparatorului Walpole (vedere laterală).

Metodele colorimetrice se bazează pe proprietatea pe care o au o serie de substanțe colorante, denumite *indicatori*, de a-și modifica culoarea după zona de pH. Există două tipuri de coloranți care sînt folosiți la determinarea pH.

Indicatorii dicromi, care își schimbă culoarea în funcție de valoarea pH. Astfel: roșul de metil are culoarea roșie la pH 4,4 și galbenă la pH 6,0; albastrul de bromtimol este galben la pH 6,0 și albastru la pH 7,4; roșul de crezol este galben la pH 7,2 și roșu la pH 8,8 etc. Încercînd succesiv soluția cercetată cu fiecare din acești indicatori, se poate determina concentrația aproximativă a ionilor săi de hidrogen.

Indicatorii monocromi își modifică numai intensitatea culorii în funcție de pH al soluției cu care vin în contact. Asemenea coloranți sînt întrebuințați în mod curent în laboratorul de microbiologie, la determinarea pH al mediilor de cultură. Vom descrie mai jos determinarea pH cu ajutorul scării de etalonare Michaelis și al comparatorului Walpole sau Hellige.

Scara de indicatori Michaelis întrebuințează coloranți din seria nitrofenolului, care cuprind la interval de 0,2 toate variațiile de culoare corespunzătoare valorilor de pH între 2,8 și 8,4. Comparatorul Walpole constă dintr-un suport prevăzut cu locuri pentru 4 eprubete numerotate (1, 2, 3, 4). Eprubetele stau cîte 2, față în față. Perpendicular pe direcția fiecărei perechi de eprubete sînt două orificii laterale, pe unde intră razele luminoase. Acestea, după ce străbat conținutul eprubetelor, ajung la ochiul observatorului.

Tehnica. Se pun în eprubetele, de la locurile nr. 2 și 4, cîte 2 ml de mediu. În eprubeta nr. 2 se adaugă 4 ml ser fiziologic (pentru diluarea mediului și slăbirea culorii) și 1 ml din indicator soluție în apă distilată de *m*-nitrofenol 0,3%. În eprubeta nr. 4 se adaugă 5 ml ser fiziologic. În eprubeta de la locul nr. 1 se pun 7 ml ser fiziologic; în locul eprubetei nr. 3 se așază tuburile etalon din scara Michaelis. Pentru stabilirea pH, schimbăm succesiv tuburile etalon, pînă îl găsim pe acel a cărui culoare este egală cu aceea a cuplului 1-2. Cifra de pe etalon reprezintă pH al mediului.

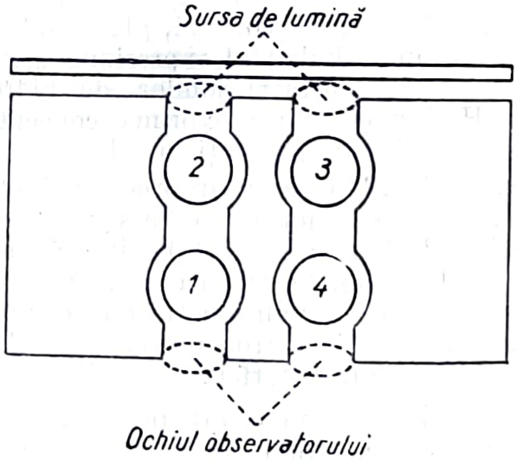


Fig. 243. — Schema comparatorului Walpole (vedere de sus).

Corectarea pH. Dacă vrem să aducem reacția mediului la un pH anumit, luăm etalonul cu valoarea de pH dorită și îl așezăm în locul nr.3 ; în locul nr. 2 se așază o eprubetă cu 2 ml mediu + 4 ml ser fiziologic și 1 ml indicator ; în locul nr. 4, o eprubetă cu 2 ml mediu + 5 ml ser fiziologic. Culoarea pH a mediului de cercetat poate fi mai închisă sau mai deschisă decît aceea a etalonului. Dacă este mai închisă (pH mai mic), se adaugă cu o pipetă dintr-o soluție de acid clorhidric 10% un număr de ml, pînă se produce egalitatea de culoare. Dacă, din contra, culoarea este mai deschisă (pH mai mare), corectarea se face prin adăugare de NaOH 1%.

Fie *n* ml cantitatea de acid sau bază care trebuie adăugată pentru corectarea a 2 ml de mediu ; pentru a afla cantitatea necesară la 1 000 ml calculăm după regula de 3 simplă :

pentru 2 ml	am întrebuințat „n" ml acid sau bază
pentru 1 000 ml	X

$$X = \frac{n}{2} 1\,000$$

MEDIILE COMPLEXE

Unele specii microbiene nu cresc de loc sau se dezvoltă slab și încet pe mediile obișnuite, ca geloza și bulionul simplu. Pentru mărirea calităților nutritive se pot adăuga, la mediile solide sau lichide, diferite substanțe organice, care aduc un aport nutritiv complex și permit creșterea în bune condiții a microbilor mai pretențioși. Mediile cele mai întrebuințate de acest fel sînt :

Bulionul-ser

Se obține prin adăugarea, la bulionul peptonat a serului de cal, de bou, iepure, berbec sau om în proporție de 1/4—1/5, operație care se efectuează în mod steril. Recoltarea sîngelui pentru obținerea serului se face în baloane sterile, puncționînd la animalele mari (cal, bou, berbec) vena jugulară, iar la animalele mici (iepure) inima. După retractarea cheagului, serul obținut se decantează în mod steril și se păstrează la rece, pînă la utilizare.

Geloza-ser

Se prepară în același mod ca și bulionul-ser, adăugînd în proporție de 1/3—1/5 ser de bou, cal, iepure etc., la geloza topită și răcită în prealabil la 45°. Pentru omogenizarea amestecului, tuburile se agită prin rulare, apoi se lasă să se solidifice în poziție înclinată.

Bulionul-sînge

Se prepară prin adăugarea de sînge defibrinat în proporții de 1 ml sînge la 8—10 ml bulion. Recolta sîngelui se face într-un balonaș steril cu perle de sticlă. Acesta este prevăzut cu un ac de puncție, care se continuă cu un tub de cauciuc, pe unde sîngele pătrunde în recipientul de sticlă. După recoltă se agită balonașul cu perle timp de 10—15 minute, pentru defibrinarea sîngelui și evitarea, în acest mod, a coagulării. Păstrarea sîngelui se face la +4° pînă la întrebuințare.

Geloza-sînge

Se prepară ca și bulionul-sînge, cu grija de a topi în prealabil geloza și a o răci la 45—50°. În cazul adăugării sîngelui la o temperatură mai ridicată, mediile obținute au culoarea șocolatie. Deși geloza-sînge șocolatie are și ea întrebuințare la unii microbi, pentru uzul curent trebuie evitată adăugarea sîngelui la o temperatură mai mare ca aceea de 45—50° (culoarea mediului este, în acest caz, roșie). Geloza sînge se repartizează, fie în tuburi care se înclină, fie în plăci Petri, rotind plăcile, pentru a realiza un amestec omogen cu sîngele.

Geloza-sînge șocolat

La bulion-agar 2% topit și menținut fierbinte se adaugă, steril, în proporție de 10%, sînge defibrinat de iepure sau om. Se amestecă și se încălzește amestecul 5 minute la 90°. Apoi se repartizează în plăci Petri sau eprubete sterile. Se controlează 24 de ore pentru sterilitate la termostat, apoi se păstrează la +4°.

Bulionul-ascită

Se prepară la fel ca bulionul-ser, numai că în loc de ser, se adaugă ascită. Recoltarea lichidului de ascită se face de la bolnavi, prin puncționarea abdomenului la locul de elecție cu un trocar, după dezinfecția prealabilă a pielii (paracenteză). Trocarul este adaptat la un tub de cauciuc, care face legătura cu un recipient de sticlă. Dispozitivul astfel constituit este sterilizat în prealabil. După recoltare, lichidul de ascită se repartizează în fiole sterile de 25—50 ml ; urmează o tindalizare în baia de apă la 56° și păstrarea la rece, după controlul sterilității.

Geloza-ascită

Se prepară ca și geloza-sînge, cu deosebirea că, în loc de sînge, se adaugă, în proporție de 1/3—1/5, lichid de ascită. Anumite substanțe organice pot servi ele însele, fără adăugare la bulion sau geloză, ca mediu. Dintre cele mai întrebuințate medii de acest fel sînt :

Laptele

După fierberea laptelui , se îndepărtează smîntîna și se centrifughează o jumătate de oră. Se trece prin hîrtie de filtru și se repartizează în tuburi, apoi se sterilizează la 110°, timp de 30 de minute.

Serul coagulat.

Se repartizează în tuburi sterile cîte 8—10 ml ser de bou și se încălzește în poziție înclinată la 75—80° în etuva de nisip, timp de 30 de minute. Mediul are o culoare albă gălbuie.

Dacă se adaugă la trei părți de ser de bou 1 parte de bulion glucozat 1%, mediul rezultat este mediul *Löffler*, care se coagulează de asemenea la etuva de nisip la 80°. Acesta este mediul de „elecție'' pentru bacilul difteric, care se dezvoltă pe el înaintea celorlalți germeni din produsul patologic.

Bulion glucozat TIEM

1. Prepararea maceratului de carne se face cu o zi înaintea preparării bulionului TIEM. La 500 g carne de mînzat tocată se adaugă 1 litru de apă și 4 g drojdie de bere presată. Se menține la 37°, timp de 12—24 de ore, apoi se filtrează prin tifon și ulterior, prin hîrtie de filtru. Filtratul se fierbe 3—5 minute și se filtrează încă o dată prin hîrtie de filtru. Maceratul astfel preparat se păstrează la rece pînă în momentul întrebuințării.

2. Prepararea peptonei se face din 250 g stomac de porc, spălat și tăiat în bucăți mici peste care adăugăm 1 litru de apă încălzită la 40—45° și 10 ml acid clorhidric concentrat. Se menține amestecul la termostatul de 37° timp de 18—20 de ore, agitînd la intervale de 1—2 ore. Se încălzește apoi amestecul timp de 5 minute la 80° și se răcește la 45°. Se adaugă la 1 litru de peptonă 2 ml de acid acetic 80% și se păstrează la rece pînă la întrebuințare. Peptona astfel preparată poate fi utilizată maximum 1 săptămînă după preparare.

3. Prepararea bulionului TIEM : se amestecă în cantități egale peptonă cu macerat, se fierbe 10 minute și se alcalinizează cu NaOH 10% pînă la un pH de 7,8. Se fierbe încă 5 minute, se filtrează prin hîrtie de filtru. Sterilizarea se face la 100°, timp de 40 de minute, 2 zile consecutiv. Apoi se adaugă glucoză în proporție de 2% folosind o soluție de glucoză 50% care se sterilizează timp de 20 de minute la 105°. Controlul sterilității se face prin termostatare, timp de 48 de ore la 37°. Mediul are o culoare ușor gălbuie și este folosit atunci cînd dorim să izolăm pneumococul din produse patologice paucimicrobiene, cum este de pildă sîngele într-o septicemie pneumococică.

Mediul cu ou Dorset

Se prepară amestecînd, în mod steril, conținutul ouălor, fie cu 10% apă sterilă (pentru creșterea bacilului tuberculos), fie cu 1/3 ser fiziologic (pentru păstrarea tulpinilor în laborator, în special a bacteriilor intestinale). Ouăle sînt spălate cu apă și săpun cu peria și ținute în alcool, pentru dezinfecție. După spălare se pot introduce și într-o soluție fenicată 5%, în loc de alcool. Se iau, de pildă, într-o hîrtie de filtru sterilă, se trec ușor prin flacără extremitățile, apoi, cu o baghetă sterilă ascuțită, se deschid cei doi poli, conținutul curgînd astfel într-un cilindru gradat, steril, deasupra căruia facem operația deschiderii ouălor. Adăugăm, în același cilindru, apă sterilă sau ser fiziologic în cantitatea dorită, omogenizăm conținutul cu o baghetă sterilă, trecem printr-un filtru de hîrtie, repartizăm în tuburi sterile, apoi urmează o tindalizare în poziție înclinată, la baia de nisip.

Se poate prepara și un *mediu lichid cu ou* utilizat în special pentru păstrarea tulpinilor de laborator, prin adăugarea, separat, a unei soluții de albuș de ou și a unei soluții de gălbenuș de ou, la bulionul de carne (mediul cu ou Besredka și Jupille).

Mediile complexe speciale

Sînt medii de cultură a căror compoziție este astfel alcătuită, încît să permită creșterea preferențială a unor specii microbiene sau să pună în evidență anumite caracteristici importante de metabolism. În practică se folosesc mai multe tipuri de medii speciale denumite, după scopul folosirii lor : medii de îmbogățire, medii de elecție, medii selective, medii diferențiale, de control al sterilității, pentru testarea mobilității bacteriilor etc.

A. MEDIILE DE ÎMBOGĂȚIRE

Le folosim în cazul în care un produs patologic conține o cantitate mică de microbi patogeni și o mare cantitate de bacterii din flora de asociație. Prin însămînțarea produsului patologic într-un mediu de îmbogățire stimulăm creșterea microbilor patogeni și inhibăm dezvoltarea florei de asociație. Astfel de medii se folosesc mai frecvent la diagnosticul infecțiilor date de enterobacteriacee și la diagnosticul purtătorilor de stafilococ și bacili difterici.

Mediul Müller-Kauffmann

Bulion de carne	90 g
Carbonat de calciu precipitat	5 g
Bilă de bou filtrată	5 ml

Se sterilizează amestecul 30 de minute la 120°, se lasă să se răcească și se adaugă la rece, în condiții de sterilitate.

Soluție verde briliant	1 ml
Soluție iodoiodurată	2 ml
Soluție de tiosulfat	10 ml

Se repartizează în tuburi sterile cîte 10—15 ml și se incubează la termostatul de 37°, timp de 48 de ore, pentru controlul sterilității. Soluțiile de verde briliant, Lugol și tiosulfat se prepară și se sterilizează separat, în felul următor :

Soluție de verde briliant :

Verde briliant	1 g
Apă distilată	1 000 ml

Se sterilizează 3 zile consecutiv cîte 1 oră, la 100°. Se păstrează la +4° indefinit.

Soluția iodoiodurată nu trebuie încălzită și se prepară astfel :

Iod	20 g
Iodură de K	25 g
Apă distilată sterilă	100 ml

Soluția de tiosulfat de Na se prepară în felul următor :

Na tiosulfat	50 g
Apă distilată ad	100 ml

Se sterilizează 15 minute la 120° și se păstrează la rece nelimitat. Se folosește în practică la izolarea salmonelelor din fecale.

Mediul de selenit de Na (Leifson)

Biselenit de Na anhidru	0,6 g
Fosfat disodic (12 H_2O)	0,5 g
Lactoză	0,4 g
Peptonă	0,5 g
Apă distilată	100 ml

Se ajustează pH la 7. Se fierbe amestecul 5 minute, apoi se repartizează cîte 10 ml în tuburi sterile. Are aceeași utilizare ca și mediul Müller-Kauffmann.

Mediul Chapman lichid

Extract de carne	4 g
Peptonă Witte	10 g
Clorură de Na	150 g
Lactoză	15 g
Apă distilată	1 000 ml

Soluția de lactoză se prepară separat, în 100—150 ml apă distilată. Celelalte substanțe se dizolvă toate, la cald, în restul de apă distilată, se corectează pH la 7,6. Se autoclavează 30 de minute la 120°. Se filtrează prin hîrtie de filtru și se adaugă soluția de lactoză. Se repartizează în eprubete sterile cîte 8—10 ml și se sterilizează prin autoclavare la 110°, timp de 20 de minute. Datorită concentrației ridicate de clorură de Na, inhibează flora de asociație din rinofaringe și permite dezvoltarea stafilococilor patogeni rezistenți la concentrații ridicate de sare.

Mediul Pike

Bulion glucozat 0,02 %	100 ml
Sînge de cal defibrinat	5 ml
Soluție apoasă sterilă cristal-violet 1/25 000	5 ml
Soluție apoasă sterilă azotură de Na $1^{0}/_{00}$	7,5 ml

Se amestecă într-un balon steril de 150 ml și se repartizează cîte 2—3 ml în tuburi sterile. Mediul trebuie preparat proaspăt, săptămînal. Este folosit ca mediu de îmbogățire pentru decelarea purtătorilor nazali și faringieni de streptococ.

Mediul O.C.S.T.

(bulion — ou — cistină — ser — telurit)

Ser de bou	150 ml
Bulion glucozat $2^{0}/_{00}$	50 ml
Telurit de K soluție 2 %	20 ml
Cistină soluție 1 %	2,2 ml
2 gălbenușuri de ou	

Se aleg ouă proaspete, se spală bine cu apă și săpun și se țin 30 de minute în alcool de 70°, se scot și se lasă să se usuce pe o hîrtie de filtru sterilă, apoi, cu un tampon de vată cu tinctură de iod se aseptizează unul din capetele oului și apoi se deschide cu o foarfecă și pensă sterilă.

Se scurge albuşul, iar gălbenuşul se recoltează într-un balonaş steril cu perle de sticlă. În acelaşi balonaş se pot recolta 2—4 gălbenuşuri.

Se recomandă ca recoltarea gălbenuşelor să se facă cu o zi înaintea preparării mediului, pentru a putea controla, printr-o însămînţare pe medii de cultură, sterilitatea lor.

Dacă după 24 de ore însămînţările de control rămîn sterile, se amestecă gălbenuşurile cu ingredientele de mai sus, în condiţii de sterilitate.

După realizarea amestecului se fac din nou însămînţări de control pe medii pentru controlul sterilităţii, iar restul se repartizează în tuburi sterile şi se păstrează la +4°, pînă în momentul folosirii.

Mediul se foloseşte pentru izolarea bacililor difterici din rino-faringele suspecţilor de difterie şi mai ales pentru diagnosticul purtătorilor de bacili.

Mediul Korthof

Peptonă Witte	400 mg
Clorură de sodiu	700 mg
Bicarbonat de sodiu	10 mg
Clorură de potasiu	20 mg
Clorură de calciu	20 mg
Fosfat monopotasic	120 mg
Fosfat disodic	440 mg
Apă distilată (preferabil bidistilată)	500 ml

Se amestecă bine ingredientele cu o baghetă de sticlă, încălzind treptat pînă la 100°. Se menţine amestecul la temperatura de fierbere 20 de minute, apoi se lasă să se răcească şi se filtrează prin hîrtie de filtru, într-un balon Erlenmeyer de 1 litru şi se sterilizează în autoclav, 30 de minute la 115°.

După răcire, se adaugă în mod steril ser inactivat de iepure (30 de minute la 56°) în proporţie de 7—10%. pH final trebuie să fie 7,2—7,4. Se distribuie steril cîte 3—4 ml în tuburi de hemoliză sterile. Se controlează sterilitatea, lăsînd mediile 48 de ore la termostatul de 37°. Se vor folosi numai mediile perfect limpezi.

Mediul Terskih

Apă distilată	90 ml
Soluţie tampon Sörensen * pH = 7,2	10 ml

Sterilizarea la autoclav, 30 de minute la 120°.

Se adaugă în mod steril 7—10 ml ser inactivat de iepure, apoi se distribuie în tuburi şi se face controlul sterilităţii prin termostatare 48 de ore la 37°.

B. MEDIILE SELECTIVE

Sînt medii de cultură speciale, a căror compoziţie este astfel realizată încît, prin includerea unor substanţe bacteriostatice, să inhibeze creşterea anumitor specii saprofite sau patogene, creînd posibilităţi de liberă dezvoltare uneia sau anumitor specii microbiene. În practica diagnosticului microbiologic al infecţiilor, se folosesc astăzi numeroase medii selective; dintre acestea vom indica formulele şi tehnica de preparare pentru cele mai importante.

Mediul Wilson — Blair

(formula clasică)

Geloză 2% pH = 7,2	100 ml
Soluţie SO_4Fe 8%	1 ml
Soluţie verde briliant 0,5%	1 ml
Amestec de bază	20 ml

Amestecul de bază se realizează prin folosirea a 4 soluţii, care se amestecă pe rînd A, B, C şi D. Amestecul preparat se păstrează la întuneric.

Soluţia A —	Apă distilată	25 ml
	citrat de bismut amoniacal	30 ml
Soluţia B —	Apă distilată	40 ml
	Sulfit de Na anhidru (Na_2SO_3)	10 ml
Soluţia C —	Apă distilată sterilă	10 ml
	fosfat disodic anhidru (Na_2HPO_4)	12.6 g

Se încălzeşte amestecul la 60°, pînă la dizolvare.

Soluţia D —	Apă distilată sterilă	25 ml
	Glucoză	10 g

Se lasă să fiarbă 1—2 minute.

Mediul se prepară în felul următor: la 100 ml geloză 2% topită şi răcită la 55°, se adaugă:

Soluţie de verde briliant	1 ml
Soluţie de sulfat feros	1 ml
Amestec de bază	20 ml

Mediul se amestecă prin agitare şi se repartizează steril în plăci. Prepararea mediului fiind destul de laborioasă şi amestecul de bază alte-

---

* Soluţia tampon Sörensen:

— Soluţia A —	fosfat disodic anhidru	11,876 g
	apă bidistilată	1 000 ml
— Soluţia B —	fosfat monopotasic anhidru	9,078 g
	apă bidistilată	1 000 ml

Se amestecă 8 ml din soluţia A cu 2 ml din soluţia B şi se realizează 10 ml soluţie tampon Sörensen.

rîndu-se prin păstrare, s-a propus, în 1953, o modificare care simplifică tehnica de preparare menţinînd calitatea mediului.

Mediul Wilson-Blair

(formulă modificată)

Agar 3% topit şi răcit la 60°	100 ml
Amestec de bază bismut-sulfit-fosfat-glucoză	20 ml
Amestec de bază citrat de fier-verde briliant	4,5 ml

Mediul se amestecă prin agitare şi se repartizează în cutii Petri.

Amestec de bază bismut-sulfit-fosfat-glucoză. Se dizolvă 30 g de citrat de bismut amoniacal în 250 ml apă distilată încălzită la fierbere. La aceasta se adaugă o soluţie obţinută prin fierberea a 100 g de sulfit de Na anhidru în 500 ml apă distilată, în care se mai adaugă 100 g de fosfat disodic cristalizat $(Na_2HPO_4 + 12H_2O)$. Amestecului de bismut-sulfit-fosfat i se adaugă, după răcire, o soluţie de glucoză obţinută prin dizolvarea a 50 g glucoză în 250 ml apă distilată fierbinte. Acest amestec se păstrează luni de zile la temperatura camerei şi la întuneric.

Amestec de bază citrat de fier-verde briliant. Se amestecă:

Soluţie 1% de citrat de fier amoniacal în apă distilată	200 ml
Soluţie 1% verde briliant în apă distilată	25 ml

Acest amestec se poate păstra la adăpost de lumină luni de zile.

Mediul „S-S”

(Salmonella-Shigella)

Extract de carne	0,5 g
Peptonă (proteoză)	0,5 g
Lactoză	1 g
Săruri biliare speciale „Difco” nr. 3	0,85 g

sau, în lipsa lor,

Dezoxicolat de Na	0,25 g
Citrat de Na	0,85 g
Tiosulfat de Na	0,85 g
Citrat de fier	0,1 g
Agar-agar	1,7 g
Roşu-neutru	0,0025 g
Verde briliant (soluţie apoasă 1/10 000)	0,33 g
Apă distilată	100 ml

Se dizolvă pe rînd ingredientele în apă distilată fierbinte, se fierbe scurt interval de timp, se corectează pH la 7,0 — 7,1 şi se sterilizează 20 de minute la 100°. Se repartizează apoi în cutii Petri. Mediul poate fi folosit şi fără adaosul de verde briliant; prezenţa acestuia are drept scop inhibarea enterococilor.

Mediul Kristensen

Geloză 2—3% pH=7,2—7,4	100 ml
Soluţie lactoză 30%	5 ml
Roşu de fenol sol. 0,2%	4 ml
Verde briliant sol. 0,5%	0,15 ml

Se topeşte geloza, se răceşte la 55° şi se adaugă apoi lactoza, roşul de fenol şi verdele briliant. Se repartizează în plăci Petri. Culoarea mediului este roşie-verzuie.

Mediul Hajna

Apă distilată	80 ml
Macerat de carne	20 ml
Peptonă	0,5 g
Clorură de Na	0,5 g
Agar-agar	1,2 g

Se amestecă maceratul de carne distilat la cald. În acest amestec se adaugă succesiv restul ingredientelor şi se corectează pH-ul la 7,5. Se filtrează prin hîrtie şi se adaugă:

Lactoză	1 g
Glucoză	0,1 g
Hiposulfit de Na	0,02 g
Sulfat feroamoniacal	0,03 g

Se corectează din nou pH la 7,4 şi se adaugă 1,25 ml soluţie apoasă de roşu de fenol 1/500. Se autoclavează 20 de minute la 110° şi apoi se repartizează în tuburi sterile. Mediul cald are culoarea galbenă; după răcire, devine roşu închis. Cînd dorim să folosim mediul pentru diagnosticul shigelelor, înlocuim în compoziţie glucoza cu manita.

Mediul Istrate-Meitert

Citrat de Na	0,8 g
Bilă de bou uscată	0,8 g
Hiposulfit de Na (cristale)	0,85 g
Citrat de fier	0,2 g
Lactoză	1,5 g
Agar 2%	100 ml

În geloza topită, cu pH de 7,8, se dizolvă pe rînd ingredientele, se amestecă bine pînă la dizolvarea completă şi apoi se adaugă 4 ml dintr-o soluţie de 1/500 de albastru de bromtimol. Se corectează pH la 7,4 cu hidrat de Na 10%. Mediul se fierbe apoi 15 minute în baia de apă, se lasă să se răcească la 55° şi se toarnă în plăci Petri. Mediul are culoarea verde şi trebuie folosit în intervalul de 48 de ore de la preparare.

Mediul Vegelsang

Bulion-agar 2% sau 4% cu pH = 7,4—7,6	1 000 ml
Zaharoză	10 g
Lactoză	10 g
Tiosulfat de Na	1 g
Soluţie albastru de bromtimol 0,2%	40 ml
Soluţie cristal violet 1‰	5 ml

Lactoza, zaharoza şi tiosulfatul de Na se dizolvă separat în apă distilată, sterilizată prin fierbere 10 minute, apoi se adaugă steril la bulionul agar topit şi răcit la 50°.

Soluţia de cristal violet 1% se prepară prin solvirea a 1 g de substanţă în 100 ml apă distilată, se maturează o săptămînă la 37°, se filtrează prin hîrtie de filtru şi se sterilizează 20 de minute în autoclav deschis. Soluţia de albastru de bromtimol se prepară solvind 0,1 g substanţă în 47,5 ml apă distilată alcalinizată prin adaos de 2,5 ml soluţie de NaOH N/10; se sterilizează prin autoclavare 20 de minute la autoclav deschis.

Soluţiile de albastru de bromtimol şi cristal violet se încorporează în proporţiile din formulă în bulionul agar topit şi răcit la 50°. Mediul turnat în plăci Petri are culoarea verzuie. Se foloseşte ca mediu selectiv pentru *enterobacteriaceae*. Coloniile de colibacili virează mediul în galben prin fermentarea lactozei, iar cele de salmonele în albastru, prin fermentarea zaharozei.

Mediul Chapman solid

Peptonă pancreatică	2 g
Clorură de Na	7,5 g
Manită	1 g
Bulion de placentă	100 ml
Soluţie roşu de fenol	2,5 ml
Agar-agar	2,3 ml

Se amestecă bulionul de placentă cu peptona şi clorura de Na, se corectează pH-ul la 7,6 şi se autoclavează 20 de minute la 110°. Se filtrează prin hîrtie şi se repartizează în balonaşe. În momentul întrebuinţării se adaugă manită şi roşu de fenol.

Soluţia de roşu de fenol se prepară din 0,1 g roşu de fenol + 5,7 ml NaOH N/20 + 35 ml apă distilată. Manita se prepară 1 la 10 în apă distilată.

Mediul Clauberg

Pentru prepararea mediului Clauberg se pregătesc în prealabil o serie de soluţii, care se păstrează la rece:

1. *Soluţie de Wasserblau 1,75%* (Standardisiertes Wasserblau 6 B. extra P. Grübler-Leipzig, R.D.G.). Se dizolvă în apă distilată la rece, apoi se sterilizează 20 de minute la 105°. Soluţia este perfect limpede şi se păstrează timp de luni de zile la rece.

2. *Soluţie de acetat de Na 25%*. Se dizolvă 25 g acetat de Na în 50 g apă distilată, la rece, apoi se completează cu apă pînă la 100 ml. Se sterilizează 20 de minute la 105°. Se poate păstra la temperatura camerei sau la gheţar.

3. *Soluţie de cistină 1%*. Se dizolvă 1 g de carbonat de Na anhidru în 10 ml apă distilată. Se încălzeşte la fierbere şi se adaugă 1 g cistină. Se încălzeşte din nou, agitîndu-se. Se adaugă restul de 90 ml apă distilată. Soluţia astfel obţinută trebuie să fie uşor gălbuie. Se sterilizează 20 de minute la 105° şi se păstrează la temperatura camerei sau la gheţar, într-un flacon de culoare brună, la adăpost de lumină.

4. *Soluţia de glucoză*. Se face o soluţie 50% glucoză în apă distilată, se sterilizează 20 de minute la 105°. Din această soluţie se adaugă 15 ml la 50 ml mediu final.

5. *Geloză 4%*, după următoarea compoziţie:

Macerat de carne	1 000 ml
Peptonă	10 g
NaCl	3 g
Fosfat disodic	2 g
Agar fibre	40 g

Se corectează pH la 7,4—7,5, se autoclavează 20 de minute la 120°, se filtrează prin vată şi se repartizează în cantitate de 42 ml sau multiplu de 42 în sticluţe sterile. Se păstrează la gheţar pînă în momentul întrebuinţării.

6. *Amestec de bază* cu următoarea compoziţie:

a) Sînge hidratat	100 părţi
b) Sînge glicerinat	5 părţi
c) Sol. 1% telurit de K	8 părţi

Amestecul de bază se realizează în felul următor:

a) Sîngele de berbec, recoltat steril şi defibrinat, se amestecă: 1 parte sînge cu 2 părţi apă distilată sterilă. Se poate recolta sîngele şi direct peste apă, cu condiţia de a agita continuu balonul, pentru a nu se produce cheaguri. Se foloseşte imediat.

b) Glicerină bidistilată neutră sterilizată în prealabil în autoclav 20 de minute, la 105°. Din glicerina sterilă se amestecă 1 volum cu 2 volume de sînge de berbec defibrinat.

Amestecul se păstrează la gheţar şi în momentul întrebuinţării trebuie să aibă cel puţin 6 săptămîni vechime. Cu cît este mai vechi, cu atît este mai de calitate.

7. *Soluţia de telurit de K 1%*. Trebuie semnalată de la început dificultatea că nu orice telurit se solvă cu uşurinţă. Cînd avem de-a face cu telurit de K greu solubil, procedăm în felul următor : se adaugă 1g de telurit de K în 80 ml apă distilată, se agită şi se caută să se dizolve cît mai mult. Se lasă în repaus 24 de ore, pentru depunerea resturilor nedizolvate şi apoi se decantează supernatantul în altă sticlă. Depozitul rămas se tratează cu o soluţie 10% de hidrat de K, picătură cu picătură, pînă la clarificarea completă. Se aduce la neutralitate cu HCl soluţia 10%, adăugînd tot picătură cu picătură. În momentul în care se depăşeşte neutralitatea, prima picătură de HCl în exces produce tulburarea soluţiei ; acest lucru trebuie evitat.

Peste soluţia neutralizată de telurit se adaugă soluţie de telurit decantată, se completează cu apă distilată pînă la 100 ml şi se sterilizează 20 de minute la 105°.

Amestecul de bază se poate păstra la rece timp de aproximativ 60 de zile. Dacă prin agitare nu produce o spumă de culoare roşie-vişinie, ci şi-a modificat culoarea spre brun, aceasta constituie indicaţia că amestecul de bază nu mai poate fi folosit.

Prepararea mediului Clauberg : se repartizează steril în 3 balonaşe sterile următoarele elemente, care se menţin la temperatura de 45—48° în baia de apă, pînă în momentul amestecului.

1. Un balonaş cu 42 ml geloză 4% topită şi răcită la 48°.

2. Un balonaş cu 50 ml amestec de bază încălzit la 48°.

3. Un balonaş în care se amestecă şi se menţin la temperatura de 48° următoarele ingrediente :

Soluţie de Wasserblau 1,75%	6	ml
Soluţie cistină 1%	1,25	ml
Soluţie de acetat de Na 25%	0,6	ml
Soluţie de glucoză 50%	3	ml

Se amestecă turnînd conţinutul balonaşului 1 peste conţinutul balonaşului 3 şi apoi totul în balonaşul 2. Se agită bine, prin mişcări circulare în ambele sensuri, dar cu grija de a evita formarea de spumă, şi se repartizează în plăci Petri, în strat subţire. Mediul trebuie să aibă culoarea roşu închis. În caz că în momentul amestecului mediul virează spre verde, se adaugă cîteva picături dintr-o soluţie 10% NaOH sterilă.

Plăcile turnate se pot menţine la gheţar maximum 4—5 zile, apoi se usucă şi nu mai pot fi întrebuinţate.

Mediul Loewenstein

La 1 000 ml apă distilată se adaugă la cald :

Asparagină	3 g
Fosfat de K bibazic	1 g
Citrat de Na tribazic	1 g
Sulfat de magneziu crist.	1 g
Glicerină neutră	60 g

Amestecul se sterilizează în 2 timpi, la început la 100° în autoclav cu capacul deschis timp de 2 ore, apoi se închide capacul şi se continuă sterilizarea la 110°, timp de 15 minute. Amestecul se păstrează la gheţar vreme îndelungată.

Pentru prepararea mediului se iau 150 ml din amestecul de mai sus într-un balon cu perle de sticlă, steril, şi se adaugă :

Feculă de cartof (sterilă)	6 g
Glicerină neutră sterilă	12 g

Se încălzeşte 15 minute la 100°, apoi se menţine 1 oră la 56°, amestecînd continuu.

Între timp se spală cu apă şi săpun 5 ouă, care apoi se antiseptizează într-o baie de alcool 70°, timp de 30 minute, după care se lasă să se usuce pe o hîrtie de filtru sterilă. După uscarea ouălor se badijonează cu capăt cu tinctură de iod şi se deschide cu o foarfecă sterilă. Se transvazează conţinutul a 4 ouă întregi şi gălbenuşul celui de al cincilea într-un pahar Berzelius steril şi se amestecă cu o baghetă de sticlă sterilă, respectînd condiţiile de sterilitate. Amestecul de ouă se toarnă în amestecul nutritiv păstrat la baie de apă la 56°. Se agită bine amestecul şi se adaugă 5 ml dintr-o soluţie apoasă sterilă de roşu de Congo sau verde malahit 2%. Se filtrează prin tifon steril şi se repartizează cîte 6—7 ml de tub. Coagularea mediului se face în baia de nisip la 80°, timp de 30 de minute, în poziţie înclinată. Pentru controlul sterilităţii mediului tuburile ţin 48 de ore la 37°, apoi se păstrează la gheţar.

Mediul Jensen

Prepararea acestui mediu se face timp de două zile consecutiv. În după amiaza primei zile se prepară, într-un pahar Erlenmeyer steril, de 1 l, următoarea soluție :

Fosfat monopotasic	2,4 g
Sulfat de magneziu	0,24 g
Citrat de magneziu	0,60 g
Asparagină	3,60 g
Glicerină neutră	12 ml
Apă bidistilată	600 ml

Într-un alt pahar Erlenmeyer steril, tot de 1 l, se pun 30 g feculă de cartof ; ambele pahare sînt sterilizate timp de 2 ore la autoclav (vapori : 100°). În dimineața zilei următoare, se curăță cu grijă două duzini de ouă proaspete, care se țin apoi o jumătate de oră într-o soluție 5 % de sodă, după care sînt spălate cu apă, și ținute din nou 10 minute într-un amestec de apă și alcool. Ouăle sînt apoi șterse cu comprese sterile, trecute rapid prin flacără și sparte într-o capsulă de porțelan sterilă, de unde sînt vărsate într-un flacon Erlenmeyer steril, așa ca să se ajungă la volumul total de 1 litru ouă și sînt bine agitate cu perle sterile (într-un flacon Erlenmeyer de cel puțin 2 l).

Soluția cu săruri se varsă în mod steril în flaconul Erlenmeyer cu feculă, iar amestecul se ține un sfert de oră într-o baie de apă la fierbere, agitînd pentru o omogenizare cît mai perfectă, apoi este pus o oră într-o baie la 56°. Amestecul este turnat peste ouă și se adaugă 20 ml dintr-o soluție 2 % verde malahit. Se amestecă prin agitare cu perle, apoi se trece prin pîlnie cu tifon steril și se repartizează cîte 6 ml în tuburi sterile 16 × 160. Tuburile sînt puse la coagulat în poziție înclinată, timp de o jumătate de oră la 83°.

După coagulare, mediul este gălbui, dar în timpul păstrării devine verzui. Vom căuta să ne dăm seama, după culoare, dacă ouăle au fost bune și dacă reacția mediului este convenabilă (pH optim = 6,9). Tuburile se păstrează 2 zile cu dopul de vată, la adăpost de lumină, pentru ca să se evaporeze apa de condensare, după care sînt capușonate. Apoi se păstrează la ghețar (+4°), fiind utilizabile timp de maximum 3 săptămîni de la data preparării. Sensibilitatea mediilor cu ouă, adică capacitatea lor de a permite obținerea de colonii plecînd de la inocule de însămînțare cu un număr de bacili cît mai redus (de exemplu, produse patologice paucibacilare), depinde de cîțiva factori, între care :

— *Un procent optim de glicerină* : în cantitate mai mare (5—10 %), glicerina favorizează obținerea de colonii abundente, dar exercită în schimb o oarecare inhibiție în „pornirea“ creșterii lor din produsele paucibacilare. De aceea, unii autori, spre a obține o creștere a sensibilității unor medii de izolare, au redus cantitatea de glicerină pînă sub 1 % (0,75 % Jensen).

— *O temperatură de coagulare adecvată*, creșterea peste un anumit nivel determinînd eliberarea din gălbenușul de ou a unor acizi grași cu acțiune bacteriostatică (maximum permis de temperatură este 85°, timp de 30 de minute).

În asemenea condiții, sensibilitatea acestui mediu pentru detectarea bacililor tuberculozei din produsele patologice este suficientă, pentru cele paucibacilare.

Însămînțarea produselor contaminate secundar se face după prealabilă tratare. Apariția coloniilor are loc după 10—15 zile, maximum pînă la 3 luni. Vegetarea bacililor hidrazidorezistenți poate întîrzia mai multe luni. Culturile trebuie examinate cel puțin la fiecare 2 săptămîni.

Mediul Herrold

Se amestecă 31 g geloză cu 1 000 ml apă distilată și cu 12 g glicerină neutră sterilă. Se dizolvă în baie de apă la fierbere (sau timp de o oră la 37°), agitînd pînă la clarificare. Se repartizează cîte 150 ml în baloane, se pun dopuri, și se sterilizează 20 de minute la 115° (baloanele se păstrează pînă în momentul întrebuințării). În momentul preparării, se adaugă la fiecare balon, în mod aseptic, cîte un gălbenuș de ou, avînd grijă ca la adăugarea gălbenușului balonul cu geloză să se găsească la temperatura de 47°. Se agită pentru uniformizare (fără a se face spumă !), se repartizează rapid, după un control prealabil al sterilității (nu se mai tindalizează).

Mediul Šula

Este un mediu sintetic, permițînd cultivarea în profunzime a bacililor tuberculozei, format din :

Fosfat disodic	2,5	g
Fosfat bipotasic	1,5	g
Sulfat de magneziu	0,5	g
Citrat de sodiu	1,5	g
Asparagină	2,0	g
Alanină	0,15	g
Cisteină	0,05	g
Glicerină (28°B)	20	g
Sol. ap. 0,2% verde malahit	2	ml
Apă distilată	1 000	ml

se sterilizează la autoclav (120°), apoi se adaugă 10% lichid de ascită sau ser, pentru a se tampona la pH = 7,0.

Mediul Sauton

Într-un balon de 1 litru se introduc următoarele substanțe :

Asparagină	4	g
Acid citric	2	g
Sulfat de magneziu	0,50	g
Fosfat bipotasic	0,50	g
Apă distilată	200	ml

Ingredientele se fierb pînă la dizolvare completă. După răcire se adaugă citrat de fier amoniacal 0,50 g, amestecînd cu bagheta pînă la dizolvare completă.

În 800 ml apă distilată se diluează separat 60 g glicerină bidistilată neutră și se adaugă apoi în balon. Se ajustează pH la 7,2 prin adăugare de amoniac cu picătura. Se repartizează în tuburi sau balonașe și se sterilizează 30 de minute la 120°.

Mediul Youmans

În 1 000 ml apă distilată se dizolvă succesiv următoarele ingrediente :

Asparagină	1	g
Fosfat monopotasic	5	g
Sulfat de K	0,50	g
Glicerină neutră	20	g

Se corectează pH la 7 cu hidroxid de Na 40% și se adaugă 1,5 g citrat de magneziu. Se sterilizează la autoclav la 115°, timp de 20 de minute. După răcire, mediul prezintă un ușor depozit la fund. Se adaugă, la întreg amestecul, plasmă umană sau ser normal de bou sterile, în proporție de 10%, în momentul folosirii mediului, apoi se repartizează, cu precauții de sterilitate, în tuburi. Se dizolvă ingredientele, în ordinea arătată, în 1 000 ml apă distilată, se ajustează la pH 7 cu NaOH 40%, apoi se adaugă citrat de magneziu 1,5 g. Se sterilizează la autoclav 20 de minute la 115°, se adaugă în mod steril plasmă (sterilizată prin filtrare), pînă a se obține o concentrație finală de 10% și se repartizează în tuburi.

Mediul Levine (E.M.B.)

Într-un balon cu 1 000 ml apă distilată se fierb, pînă la dizolvare completă, următoarele ingrediente :

Peptonă	10	g
Fosfat bipotasic	2	g
Agar fibre	15	g

După dizolvare și răcire se aduc la volumul inițial cu apă distilată și se repartizează cîte 100 ml în sticluțe sterile. Se sterilizează la autoclav 30 de minute la 120° și se păstrază la rece. În momentul întrebuințării se topește agarul și se adaugă, la 100 ml amestec, 5 ml soluție sterilă de lactoză 20%, 2 ml soluție apoasă 2% de eozină galbenă și 1,3 ml soluție apoasă 0,5% albastru de metilen. Se omogenizează amestecul prin mișcări circulare în ambele sensuri și apoi se toarnă în plăci Petri sterile.

Mediul Endo

La 1 000 ml apă distilată de dizolvă la cald :

Peptonă	10	g
Extract de carne	5	g
Agar fibre	30	g

Se corectează pH la 7,6, se autoclavează 15 minute la 115° și după filtrare se repartizează în sticluțe sterile cîte 100 ml. Se sterilizează 20 de minute la 120° și se păstrează la rece. Pentru a prepara mediul Endo se pregătesc următoarele soluții :

a) Soluție sterilă de lactoză 20%;

b) Soluție apoasă sterilă de sulfit de Na chimic pur (0,5 g sulfit în 5 ml apă distilată sterilă);

c) soluție saturată alcalină de fucsină bazică.

Se topesc 100 ml din amestecul nutritiv și se răcește la 55°; se adaugă steril 5 ml din soluția de lactoză 20%. Într-o eprubetă sterilă se toarnă 1 ml din soluția alcalină de fucsină, bazică apoi se adaugă picătură cu picăură din soluția de sulfit de Na, agitînd continuu, pînă se obține decolorarea sau o nuanță ușor roz.

Amestecul decolorat de fucsină-sulfit se adaugă și el peste amestecul de geloză nutritivă și după agitare se toarnă în plăci Petri sterile

Mediul turnat în plăci este ușor roz sau incolor. Mediul Endo trebuie preparat în ziua însămînțării și ferit de acțiunea luminii, care îl înroșește.

Bulion-bilă cu lactoză și verde briliant

În 500 ml apă distilată se dizolvă la cald:

Peptonă	10 g
Lactoză	10 g

Se adaugă 200 ml de bilă de bou proaspătă, recoltată steril, sau 20 g de bilă uscată, dizolvată în 200 ml apă distilată. Soluția de bilă uscată trebuie să aibă pH de 7—7,5. Se amestecă și se completează cu apă distilată pînă la volumul de 975 ml. Se corectează pH la 7,4. Se mai adaugă apă distilată pînă la volumul total de 1 litru. Se filtrează prin vată și se distrebuie în tuburi prevăzute cu tubuleț de fermentație. Se sterilizează la autoclav 15 minute, la 120°.

Mediul Peizer-Steffen

Se pregătesc 2 amestecuri, care se sterilizează separat și se păstrează la gheţar pînă în momentul întrebuințării.

Amestec A

Peptonă	20 g
Clorură de Na	5 g
Agar-agar	20 g
Apă distilată	1000 ml

Se corectează pH la 7,4 cu ajutorul fosfatului disodic și se sterilizează la autoclav 20 de minute la 120°.

Amestec B

Plasmă sterilă de cal	30 ml
Hemoglobină (globule roșii 5% în apă distilată)	50 ml
Soluție de glucoză 30% sterilă	0,7 ml
Soluție de fosfat disodic 15%	10 ml

La 100 ml din amestecul A, topit și menținut la baia de apă la 60°, se adaugă 30 ml de amestec B. Se pot adăuga în plus 0,3—0,6 ml din soluție 0,4% de abastru de Nil, care inhibă creșterea stafilococului și unor difterimorfi. Mediul se repartizează în cutii Petri sterile și este transparent. Se poate păstra cîteva zile la gheţar.

Mediul Dieudonné

Se amestecă în părți egale, sînge de bou defibrinat și soluție normală de hidroxid de K. Amestecul se încălzește la 100°, timp de 30 de minute. La 3 părți amestec se adaugă 7 părți agar. Mediul fiind foarte alcalin, însămînțarea se va face după 24 de ore, timp în care se va evapora amoniacul care s-a format în amestec. Mediul se repartizează în plăci Petri sterile și are culoare roșie-cărămizie.

Mediul cu telurit de K

Apa peptonată, care conține 1% peptonă și 0,5% clorură de Na, se tratează cu carbonat de Na (circa 0,2%), pentru a obține pH = 9

Apoi se adaugă taurocolat de Na în proporție de 0,5%. Teluritul de K se adaugă apoi în concentrație de 1 la 200 000 și amestecul se repartizează în balonașe Erlenmeyer de 25 ml, sau în tuburi sterile obișnuite. Acest mediu a fost folosit cu succes la izolarea vibrionului holeric în timpul epidemiei de holeră din Egipt, în 1947.

C. MEDIILE DE ELECȚIE

Sînt medii complexe care, deși nu conțin substanțe bacteriostatice, prin compoziția lor oferă condiții preferențiale de creștere a unor anumite specii bacteriene, care se dezvoltă mult mai rapid decît flora de asociație din produsul patologic însămînțat.

Mediul Löffler

La 3 părți ser steril de bou se adaugă 1 parte bulion glucozat 1%, se repartizează în eprubete sterile și se coagulează la baia de nisip la 80°, timp de 30 de minute. Pe acest mediu bacilul difteric se dezvoltă în 8—16 ore, pe cînd flora de asociație din rino-faringe, abia după 22—24 de ore.

Mediul Mac Coy

Într-un balon Erlenmeyer cu perle, steril și cîntărit, se introduc 6 gălbenușuri de ou și un albuș. Se amestecă și se omogenizează. Se cîntărește din nou, pentru a afla greutatea amestecului de ou, iar la 6 părți amestec de ouă se adaugă 4 părți ser fiziologic steril. Se repartizează în tuburi și se solidifică în poziție înclinată la baia de nisip 30 de minute, la 73–75°, timp de 2 zile consecutiv.

Mediul Francis

La o cantitate de 9 volume de agar 2%, topit și răcit la 55°, se adaugă 1 volum soluție sterilă de glucoză 10% și 1 volum dintr-o soluție sterilă de cistină 1%. Se mai poate adăuga sînge defibrinat în proporție de 10%.

Se repartizează în tuburi și se lasă să se solidifice în poziția înclinată.

Mediul Condrea

Se iau 100 g ficat de vită, 100 g carne, 100 g splină, 100 g pancreas, 100 g cheag de sînge și 200 g stomac de porc. Toate se trec prin mașina de tocat, se adaugă 1 600 ml apă de robinet și 15 ml acid clorhidric 25%. Se agită bine și se menține la baia de apă la 50° pentru 12–14 ore. Se trece apoi la baia de apă la 100°, pentru a inactiva enzimele și a întrerupe digestia; pH al amestecului trebuie să rămînă în zona de aciditate. O reacție alcalină indică o digestie prea înaintată și mediul își pierde din calități.

Se filtrează, se ajustează pH la 7,2–7,3. Se autoclavează pentru precipitare 30 de minute la 110°, se filtrează și se corectează din nou pH la 7,2–7,3.

La acest amestec se adaugă 2% agar spălat și topit, după care se repartizează în flacoane, în cantitate de 80 ml. Se sterilizează la 110° timp de 30 de minute și se păstrează la ghețar +4°. În momentul utilizării, se topește la baia de apă conținutul unui balonaș de 80 ml, se răcește la 55° și se adaugă steril 10 ml dintr-o soluție de glucoză 10%, 10 ml sînge defibrinat steril și 3 ml dintr-o soluție sterilă de cistină 1%. Se amestecă prin agitare și se repartizează în tuburi sterile sau în plăci Petri. Pe acest mediu se dezvoltă, în condiții deosebit de bune, *Pasteurella tularensis*.

Bulion-ficat și geloză-ficat

Huddleson

Se folosește pentru cultivarea brucelelor. Compoziția mediului e următoarea:

Bulion-ficat

Clorură de Na	5 g
Peptonă (bacto)	10 g
Macerație de ficat de vacă	500 ml
Apă	500 ml

Geloză-ficat

Clorură de Na	5 g
Peptonă (bacto)	10 g
Macerație de ficat de vacă	500 ml
Geloză spălată	20 g
Apă	500 ml

Se dizolvă ingredientele de mai sus în 500 ml apă, se adaugă macerația, se ajustează pH la 6,6 și se sterilizează 20 de minute la 115°.

La bulion se adaugă 20‰ geloză și se obține geloza-ficat. La geloza-ficat topită și răcită la 45–50° se adaugă, steril, diluțiile de fucsină și tionină necesare diferențierii tipurilor de brucele.

Medii lichide și solide cu macerat de carne după Castaneda

(pentru cultivarea brucelelor prin hemocultură)

Mediu lichid	Macerat de carne	100 ml
	Peptonă	2 g
	Citrat de sodiu	4 g
	Glucoză	1 g
	Clorură de sodiu	0,5 g

pH = 7,2

Mediu solid	Macerat de carne	100 ml
	Peptonă	2 g
	Glucoză	1 g
	Citrat de sodiu	0,5 g
	Clorură de sodiu	0,5 g
	Geloză	3 g

pH = 7,2

Se repartizează în două flacoane Erlenmeyer (de 100–150 ml) 4–5 ml mediu gelozat steril; se înclină flaconul și se lasă să se întărească pe un perete. Apoi se repartizează cîte 5 ml bulion citrat steril. Se controlează 24 de ore la 37°.

Citratul de sodiu are funcții multiple în favorizarea hemoculturii: este anticoagulant, antialexic, antibactericid și antifagocitar. Citratul se poate înlocui prin lichior, din care se adaugă cîte 0,5–0,1% la mediul solid și la mediul lichid.

Mediul Hair *cu macerat din placentă sau cord de bovine și adaos de antibiotice*

(pentru cultivarea brucelelor prin hemocultură)

Macerat de placentă sau Cord de bovine	1 000 ml
Geloză	30 g
Sînge de cal	50 ml
Soluție 0,4 % violet de gențiană	1 ml
Polimixină B	6 000 u.
Penicilină G crist.	5 000 u.

pH = 6,8 – 7

Se repartizează cîte 8—10 ml în falcoane sterile de 150 ml pentru hemocultură în care se efectuează recolta direct. Prezența antibioticelor împiedică dezvoltarea florei de contaminare, eventual prezentă și favorizează creșterea brucelelor.

Mediul Bordet-Gengou

Într-un balon cu 1 000 ml apă distilată se amestecă ingredientele de mai jos :

Cartofi curățați și fragmentați	125 g
Glicerină neutră	10 ml
Clorură de Na	5,6 g
Geloză (bacto) pulvis	30 g

Cartofii, tăiați în bucăți mărunte, se introduc într-un sac de tifon și se cufundă într-un amestec format din glicerol și 500 ml apă distilată. Se fierbe aproximativ 30 de minute, se răcește și se clarifică prin centrifugare. Se adaugă restul de apă distilată pînă la 1 000 ml, clorura de Na și geloza. Se încălzește pînă la fierbere, pentru dizolvarea gelozei. Pentru realizarea amestecului final, se adaugă 200 ml sînge de oaie defibrinat recoltat steril, se amestecă și se toarnă în plăci Petri sterile.

D. MEDIILE DIFERENȚIALE

Sînt deosebit de numeroase în microbiologia medicală și compoziția lor are drept scop evidențierea anumitor procese biochimice caracteristice pentru metabolismul unei specii microbiene. Sinai și Birgher le clasifică, după compoziție, în medii cu substanțe proteice care se modifică în prezența diverselor enzime bacteriene (proteaze, hemolizine etc.), medii cu indicatori, care evidențiază fermentarea anumitor zaharuri sau alcooluri, medii cu substanțe chimice, care se modifică datorită acțiunii oxidante sau reductoare a bacteriilor (roșu neutru, albastru de metilen etc.) și medii care conțin substanțe chimice indiferente, care pot servi ca sursă de hrană pentru unele specii microbiene și nu sînt asimilate de altele.

Mediul Fergussen

(utilizat pentru testul ureazei)

Uree	2 g
Fosfat monopotasic	0,1 g
Fosfat bipotasic	0,1 g
Clorură de sodiu	0,5 g
Alcool	1 ml
Apă distilată	100 g

Indicatorul este roșul fenol în soluție de 0,2%. Mediul are culoarea galbenă. Într-un tub se pun 0,1 ml mediu și se însămînțează. Tubul se pune la termostat și se face citirea la fiecare 5 minute. Dacă tulpina microbiană cercetată produce urează, ureea se descompune și mediul virează în violet.

Mediul pentru evidențierea transformării nitraților în nitriți

Se folosește un mediu cu geloză nutritivă și nitrat de K.

Macerat de carne	1000 ml
Peptonă	5 g
Nitrat de K	1 g
Agar	12 g

După însămînțare se folsesc următorii reactivi : acid sulfanilic, dizolvat în 1 000 ml SO_4H_2 în concentrație de 1/20 ; naftilamină 5 g dizolvate în 1 000 ml. SO_4H_2 în concentrație de 1/25. Se adaugă cîte 5 picături din fiecare reactiv și prezența nitriților în mediul de cultură este pusă în evidență prin apariția unei culori violete sau roșii.

Mediul Clark și Lubs

Peptonă	5 g
Glucoză	5 g
Fosfat bipotasic	5 g
Apă distilată	1000 ml

Pentru evidențierea acidității crescute pe care unele specii microbiene o produc în timpul creșterii, se adaugă la acest mediu cîteva picături soluție alcoolică 1% de roșu de metil. Culoarea roșie indică o reacție pozitivă, adică un pH scăzut (cantitate mare de acid), culoarea galbenă indică aciditate scăzută, deci reacție negativă. Același mediu se utilizează pentru evidențierea producerii de acetil-metil-carbinol. La o cultură de 3—4 zile se adaugă o cantitate egală de hidroxid de K 10%. Se pune tubul cîteva minute în apă care fierbe și se adaugă două picături de apă oxigenată. Culoarea roz indică o reacție pozitivă.

Geloza cu subacetat de plumb

Se folosește geloză nutritivă obișnuită 2% și soluție apoasă sterilă 10% subacetat de plumb. Se topesc prin fierbere un număr de tuburi cu geloză simplă 2% și se adaugă steril, în fiecare tub, 0,1 ml din soluția sterilă de subacetat de plumb. Se amestecă prin agitare și se lasă să se solidifice în poziție verticală. Însămînțarea se face prin înțepare. Tupinile care produc H_2S înnegresc mediul în zona de creștere a culturii.

Mediile citratate Koser și Simmons

Clorură de sodiu	5 g
Sulfat de Mg	0,2 g
Fosfat de amoniu	1 g
Fosfat de potasiu	1 g
Citrat de sodiu	2 g
Apă distilată	1000 ml

Se însămînțează cu ansa foarte puțin inocul. Speciile microbiene care folosesc citratul ca unică sursă de carbon, vor crește tulburînd uniform mediul; adăugînd geloză 2% și indicator albastru de bromtimol obținem mediul solid Simmons.

Mediul Hiss cu indicator Andrade

Se folosește pentru evidențierea spectrului de fermentație a zaharurilor. Se dizolvă 7 g peptonă și 1,4 g PO_4HNa_2 în 1 400 ml apă distilată. Se ajustează pH la 7,8 cu soluție NaOH 10%. Se fierbe, se filtrează prin hîrtie de filtru. Se sterilizează în autoclavul deschis, după care se adaugă 11 ml din soluție sterilă de indicator Andrade.

La mediul final se adaugă soluțiile de zaharuri, pentru a da o concentrație finală de 0,4% pentru amidon și 1% pentru glucoză, zaharoză maltoză, manită, levuloză, dextrină, glicogen etc. Se procedează în felul următor: la 90 ml mediu final, se adaugă steril 10 ml dintr-o soluție 10% de zahar, se amestecă și se repartizează în tuburi de fermentație cîte 1–1,5 ml. Pentru fiecare zahăr în parte se procedează la fel. Întreaga serie de tuburi repartizate se controlează pentru sterilitate, prin termostatare timp de 24 de ore, apoi se păstrează la gheţar.

Prepararea indicatorului Andrade. Se dizolvă în 100 ml apă distilată 0,5 g fucsină acidă și se adaugă treptat 16 ml soluție normală NaOH, pînă la decolorarea fucsinei; soluția se sterilizează 30 de minute la 115° și se păstrează la gheţar.

Mediul Drigalski-Conradi

La o cantitate de geloză 3% topită se adaugă 1% lactoză și turnesol în soluție 10%, pînă cînd mediul capătă culoarea violet-ametist. Se repartizează în cutii Petri, se controlează sterilitatea prin termostatare. Dacă se adaugă și soluție de cristal violet, mediul are și valoare selectivă; se folosește pentru diferențierea speciilor lactozo-pozitive de cele care nu fermentează lactoza.

Lapte sau bulion cu adaos de albastru de metilen

Într-o eprubetă cu 5 ml bulion (sau lapte) steril se adaugă o picătură din soluția sterilă apoasă 1% albastru de metilen. Se însămînțează și se așază tuburile la termostat. După 24 de ore se examinează. Decolorarea completă indică o reacție pozitivă, colorația verde, o reacție slab pozitivă, lipsa decolorării, o reacție negativă.

Bulionul cu roșu neutru

Într-un tub cu 6–8 ml bulion se adaugă 1–2 picături roșu neutru soluție apoasă 2% sterilă. După însămînțare și termostatare, se constată reducerea roșului neutru în foarte scurt timp. Dacă bacteriile au proprietăți reductoare slabe, se toarnă un strat de parafină lichidă la suprafața mediului, pentru ca reducerea să nu fie anihilată prin oxidarea în contact cu aerul.

MEDII DE CULTURĂ PENTRU ANAEROBI

Bulion cu ficat și carne

Ficat de vițel	250 g
Carne de vițel	250 g
Apă de robinet	1000 ml

Se toacă fin carnea și ficatul și se amestecă bine cu apă într-o oală smălțuită. Se așază la fiert și se fierbe aproximativ 20 de minute, amestecînd tot timpul. Se filtrează apoi prin tifon şi se obţine astfel maceratul de ficat şi carne.

Amestecul de carne cu ficat rămas pe filtru se strînge şi se spală de 4—5 ori cu apă distilată, se usucă într-o cîrpă curată şi se repartizează, cu ajutorul unei spatule, în eprubete sterile aproximativ 3 ml de eprubetă. La maceratul de carne şi ficat filtrat, se adaugă cantitatea de apă necesară pentru a-l readuce la volumul de 1 000 ml, se încălzeşte moderat şi se adaugă :

Peptonă tripsică	15 g
Clorură de Na	5 g

După dizolvare completă se ajustează pH la 8 şi se autoclavează 20 de minute la 120°. Se adaugă glucoză în proporţie de 20 g$^{0}/_{00}$. Se filtrează prin hîrtie de filtru şi se repartizează cîte 6 ml în eprubetele care conţin cîte 3 ml de amestec de carne şi ficat. Se repartizează în fiecare eprubetă cu mediu cîte 2 ml ulei de vaselină steril.

Se sterilizează la autoclav la 115°, timp de 15 minute, sau la autoclav deschis (vapori fluenţi) la 100°, timp de 30 de minute, 3 zile consecutiv. Adăugarea uleiului de vaselină steril nu este absolut obligatorie; este necesar însă, dacă renunţăm la el, să regenerăm mediul prin fierbere înaintea întrebuinţării.

Geloza Veillon

Se macerează 500 g de carne degresată şi tocată mărunt, într-un litru de apă, timp de 2—3 zile, pînă la apariţia unei putrefacţii avansate. Se filtrează prin tifon dublu şi se adaugă în filtrat 10 g peptonă şi 5 g ClNa. Se încălzeşte într-o oală smălţuită amestecînd continuu, pînă la dizolvarea ingredientelor, se adaugă apoi 10 g de geloză spălată şi tăiată mărunt. Se alcalinizează cu hidrat de Na, pînă cînd lichidul albăstreşte net hîrtia de turnesol. Lichidul răcit la 60° se clarifică prin adăugarea unui albuş de ou, bătut în 100 ml apă, în care am dizolvat în prealabil 10—15 g de glucoză şi 1 g de azotat de potasiu. Se amestecă bine şi se precipită apoi 20 de minute la 120°. Se filtrează apoi la cald prin hîrtie de filtru; lichidul trebuie să fie foarte clar. Se distribuie în tuburi sterile într-o coloană de 10—12 cm înălţime. Se închide cu vată şi se sterilizează 15 minute, la 115°. Este util să folosim tuburile înguste şi lungi de tip Weinberg, pe de o parte pentru a economisi mediul, iar pe de altă parte, cu scopul de a avea cît mai multe tuburi la dispoziţie pentru obţinerea coloniilor izolate.

Geloza semisolidă sau moale

Este tot o geloză după formula Veillon, dar conţinutul în agar se scade la un sfert, adică 2,5 g la $^{0}/_{00}$ în loc de 10 g la $^{0}/_{00}$. Aceasta face ca mediul să aibă o consistenţă moale, semifluidă. Este un mediu util pentru efectuarea izolărilor prin diluţie, sau pentru realizarea hemoculturilor anaerobe.

Mediul Kondratieva

Lapte	8 g
Peptonă	10 g
ClNa	5 g
Glucoză	1 g
Sulfit de Na	6 g
Apă distilată sterilă	1000 ml

Se repartizează în tuburi, se încălzeşte la baia de aburi la 100°, timp de 15—30 de minute. După răcire se adaugă clorura de fier în soluţie 2,7% sterilă, cîte 2 picături la un tub.

Se foloseşte pentru diferenţierea *Cl. Welchii* de celelalte clostridii. Acest microb, după 16—24 de ore de incubaţie la 37°, produce înnegrirea mediului.

Geloza sînge Zeissler

Geloză peptonată cu pH = 7,2—7,4	100 ml
Glucoză soluţie 20%, sterilă	10 ml
Sînge de berbec sau cal defibrinat	20 ml

Se topeşte geloza şi se răceşte la 50°, se adaugă steril cu pipeta soluţie de glucoză, apoi sîngele defibrinat, amestecînd încet. Apoi se repartizează în cutii Petri cîte 8—10 ml. După solidificare se lasă la uscat la 37°, timp de 6 ore, pentru eliminarea apei de condensaţie.

MEDII PENTRU CONTROLUL STERILITĂŢII PRODUSELOR BIOLOGICE

Mediul Brewer pentru aerobi

Reprezintă cel mai adecvat mediu pentru controlul sterilităţii produselor biologice sub aspectul prezenţei florei bacteriene aerobe:

Apă bidistilată	2 000 ml + 5% extravolum
Peptonă Witte	10 g
Extract de carne	2 g

Hidrolizat de lactalbumină	2 g
Clorură de Na	6 g
Dextroză	10 g

După dizolvarea substanţelor la cald, sub continuă agitare, se ajustează pH la 7,5 cu NaOH N. Extractul de levură şi hidrolizatul se dizolvă separat în 300 ml apă şi apoi se adaugă amestecului total, însă înaintea ajustării pH.

Se autoclavează pentru precipitare 10 minute la 110°, se filtrează prin hîrtie. Se repartizează în tuburi închise cu dop de vată şi tifon şi se sterilizează în autoclav 30 de minute la 110°. Se pot conserva bine la gheţar şi la temperatura camerei, maximum 60 de zile.

Mediul Brewer pentru anaerobi

Apă bidistilată	1 000 ml
Peptonă Witte	2,5 g
Extract de carne	1 g
Extract de levură	2 g
Hidrolizat de lactalbumină	10 g
L-cistină hidroclorică	0,5 g
Clorură de sodiu	4 g
Natriu tioglicolic	1 g
Dextroză	5 g
Albastru de metilen	1 ml dintr-o soluţie apoasă 0,2%

După dizolvarea substanţelor sub agitare continuă, se corectează pH la 7,5 cu NaOH N. Se autoclavează 20 de minute la 120°, se filtrează prin hîrtie de filtru şi se repartizează în tuburi. Se sterilizează 30 minute la 115°. Cînd se păstrează mai mult timp, trebuie regenerat prin scurtă încălzire înaintea folosirii. Prezenţa tioglicolatului ajută pentru a neutraliza toxicitatea prezervantelor mercuriale conţinute în produsele biologice care se controlează. Extractul de levură şi hidrolizatul de lactalbumină se dizolvă separat la cald şi apoi se adaugă în amestecul global; tuburile cu mediu se păstrează obligatoriu la gheţar de + 4°.

MEDII PENTRU STUDIUL MOBILITĂŢII BACTERIILOR

Mediul Tittsler-Sandholzer

Bulion de carne	1 000 ml
Peptonă	5 g
Geloză pulvis	5 g

Se ajustează pH la 7,2, se sterilizează şi se repartizează în tuburi în poziţie verticală. Însămînţarea se face prin înţepare în centrul mediului. La bacilii mobili se remarcă difuzarea lor în mediu în toate direcţiile, de la linia de însămînţare, dînd mediului un aspect opalescent. Bacilii imobili cresc exclusiv de-a lungul liniei de însămînţare şi lasă mediul transparent.

Manualul „*Mediile de cultură în bacteriologia medicală*'', elaborat de un colectiv sub conducerea dr. L. Mesrobeanu, de la Institutul „ Dr. I. Cantacuzino'' (Editura medicală, Bucureşti, 1960) este necesar să fie folosit obligatoriu în fiecare laborator de spital, pentru completarea noţiunilor succinte expuse mai sus.

BIBLIOGRAFIE

* * * — Bakteriologische Nährboden, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1953.

* * * — Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical laboratory procedures, Ediţia 9-a, 1953, Detroit-Michigan.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, Ediţia a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 175—191 (Notions générales sur les milieux de culture) şi p. 197—200 (Creşterea microbiană).

GOSTEV V. S. — Bazele biochimice ale bacteriologiei medicale, Ed. ştiinţifică, Bucureşti, 1953.

HALLMANN L. — Bakteriologie und serologie, Ediţia a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 628—658.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approved laboratory tehnic, Ed. Appleton-Century, 1945, p. 327—362.

KOZLOV J. A. — Pitalelnie Sredi v Mediţinski Mikrobiologhii, Medghiz, Moscova, 1950.

LEVINE M., SCHOENLEIN H. W. — A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms, Ed. Bailliere-Tindall-Cox, Londra, 1936.

MACKIE J. T., MC. CARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology, Ediţia a 9-a, Ed. Livingstone Edinburgh, 1956, p. 83—202.

MARX A. — Folosirea hidrolizatului acid de fibrină în prepararea mediilor nutritive, Microbiologia, (Bucureşti), 1957, nr. 5, p. 460.

MESROBEANU LYDIA, MARX A., STAVRI D., TEODORESCU G. — Mediile de cultură în bacteriologia medicală, Ed. medicală, Bucureşti, 1961.

MESROBEANU LYDIA, PĂUNESCU E. — Fiziologie microbiană, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1960.

MOGA V., BERTESCU L., PREDOVICIU M. F., TĂNASE GH. — Aparat automat pentru distribuirea mediilor de cultură şi fiolare în condiţii sterile şi în volume măsurate, *Microbiologia*, (Bucureşti), 1956, nr. 3, p. 82—87.

POPOVICI MARCELA — Bacteriologie medicală, (sub redacţia prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 214—221 şi 228—230.

PEŞKOV M. A. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, G. J. Sinai şi O. G. Birgher, Ed. de Stat pt. literatură ştiinţifică 1952, p. 68—130.

PREDTECENSKI V. E., BOROVSKAIA I. M., MARGOLINA L. T. — Metode de laborator clinic, Ed. ştiinţifică, Bucureşti, 1953, p. 669.

VASILIU E. — Mediul Wilson-Blair uscat, *Microbiologia*, (Bucureşti), 1956, nr. 3, p. 81—82.

WHITBY L., HYNES M. — Medical bacteriology, Ediţia a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 22—34.

METODE DE RECOLTARE, CONSERVARE ŞI TRANSPORT PENTRU PRODUSELE PATOLOGICE

Obţinerea unui rezultat corect în orice examen bacteriologic, executat în vederea precizării diagnosticului unei infecţii, presupune respectarea riguroasă a unor reguli de procedură şi a unor metode de lucru, a căror neglijare poate atrage cele mai grave erori de diagnostic.

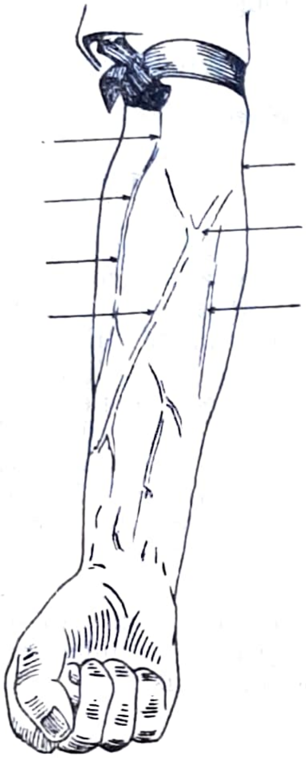


Fig. 244. — Tehnica realizării hemostazei venelor din plica cotului. Săgeţile indică locurile cele mai favorabile pentru puncţionarea venei.

Medicul de laborator este obligat să cunoască şi să respecte întocmai aceste reguli şi metode, care, de altfel, sînt relativ simple şi anume:

— modul de recoltare al produselor patologice;

— metodele de conservare a acestora şi

— modalităţile lor de transport, de la bolnav la laborator.

Natura variată a produselor patologice de examinat: puroi, lichide din cavităţile seroase, articulare, lichid cefalorahidian, urină, sînge, spută, fecale etc. face ca procedeele de ales în vederea examenului să fie şi ele variate.

Recoltarea unui produs patologic necesită observarea cîtorva reguli de procedare, care asigură executarea în condiţii optime a examenului solicitat. Acestea sînt:

— folosirea unor recipiente curate şi sterilizate în prealabil, la nevoie, prin fierbere prelungită sau flambare;

— evitarea contactului cu antiseptice a produsului;

— indicarea clară şi precisă a provenienţei produsului; numele şi prenumele bolnavului, vîrsta, sexul, adresa, felul produsului de cercetat;

— expedierea cît mai rapidă a acestuia la laborator;

— ambalarea lui cît mai ermetic cu putinţă, spre a se evita contaminările prin contactul cu mediul înconjurător.

O dată ajunse pe masa din laborator, produsele patologice vor fi:

— triate şi păstrate numai acelea care respectă condiţiile indispensabile de prezentare, în ce priveşte cantitatea, modul de ambalare şi condiţiile în care au fost prelevate de la bolnav;

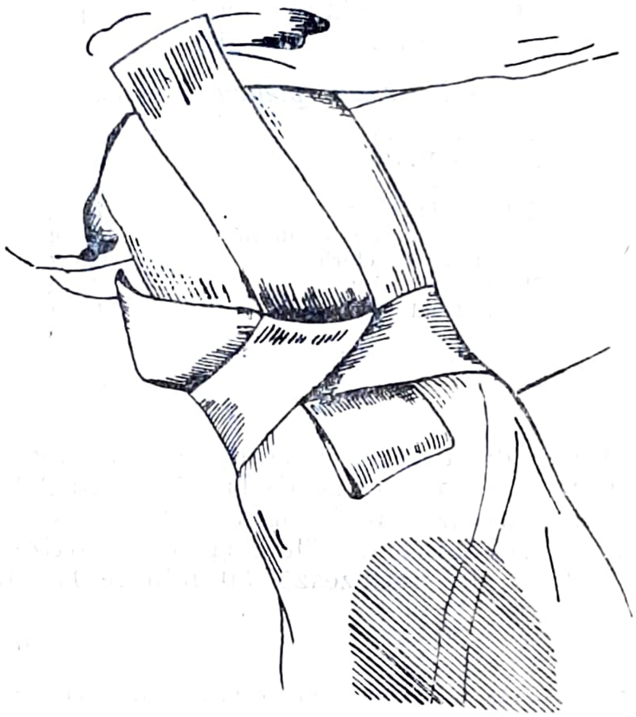


Fig. 245. — Tehnica hemostazei corecte prin bandă elastică şi aseptizarea de puncţie în vederea prelevării pentru hemocultură.

— înregistrate şi etichetate, indicîndu-se provenienţa şi numărul de ordine al laboratorului;

— prelucrate fără întîrziere, în cazul în care, prin păstrare, ar interveni modificări care pot afecta valabilitatea examenului.

Tehnica recoltării variază cu natura produsului de cercetat: sînge, revărsări lichidiene (pleurale, peritoneale, pericardice, articulare etc.), lichid cefalo-rahidian, puroi, urină, fecale, secreţii şi serozităţi, exsudate şi transsudate, spută etc.

Sîngele se recoltează în vederea următoarelor examene:

— examenul bacteriologic, indicat ori de cîte ori se cere căutată prezența agentului patogen în circulația generală (febră tifoidă, endocardită lentă, bruceloză, diverse septicemii)

— examenul serologic, cînd prezența și titrul anticorpilor specifici în ser ar putea da indicații asupra naturii agentului patogen;

— examenul parazitologic, în care punerea în evidență a unui parazit (de exemplu, hematozoarul palustru) poate preciza în multe cazuri diagnosticul de certitudine al unei afecțiuni;

— examenul morfologic, care dă indicații importante asupra diagnosticului bolilor de sînge, sau al variațiilor patologice ale elementelor figurate, determinate de diferite afecțiuni.

Recoltarea sîngelui, în vederea examenului bacteriologic, se face prin puncție venoasă, în condiții de asepsie riguroasă: hemocultură. Aceasta se practică cu ajutorul unei seringi de 10—20 cm, de preferință de sticlă (seringă Luer), cu ac de platină sau contraacid (5—6 cm), sterilizate în prealabil la autoclav (30 de minute la 120°), într-un tub cilindric de sticlă, astupat cu dop de vată (la nevoie, se poate steriliza și prin fierbere, timp de 30 de minute, în apă alcalinizată). Se aplică un garou pentru a realiza o hemostază relativă, cu scopul de a face venele turgescente și deci, mai accesibile. Se antiseptizează larg regiunea plicii cotului (venele medio-bazilică sau medio-cefalică), sau oricare altă regiune cu vene accesibile, prin pensulare cu tinctură de iod și apoi cu alcool și se puncționează vena cît mai rapid cu putință. Se extrag 10—50 ml sînge total (după natura probabilă a infecției), care se însămînțează imediat în condiții de strictă sterilitate în recipientele cu medii lichide, dinainte pregătite:

— un balonaș cu 200 ml bulion glucozat 1%
— un balonaș cu 200 ml bulion-ser
— un tub cu 10 ml bulion simplu peptonizat
— un tub cu 10 ml bulion-ascită
— un tub cu 10 ml bulion ser + ulei de parafină steril 1 ml).

La laborator, după 24—48 de ore se fac treceri din aceste medii, pe geloză înclinată 2%, geloză-ser, geloză-ascită, apă peptonată etc. (după caz).

La copii, puncția venoasă se practică în vena jugulară, sau în sinusul sagital, prin fontanelă. Alteori, spre a asigura la maximum condițiile de sterilitate necesare recoltării sîngelui pentru hemocultură se atașează direct la balonul cu mediu acul de puncție venoasă, prin intermediul unui tub de cauciuc de circa 10—15 cm lungime. La o extremitate a tubului este fixat acul de puncție venoasă, introdus într-o eprubetă de hemoliză, iar la cealaltă extremitate cauciucul este adaptat la un tub de sticlă care trece prin dopul de vată și pătrunde în flaconul cu mediu. Acest dispozitiv se sterilizează la autoclav 30 de minute la 120°.

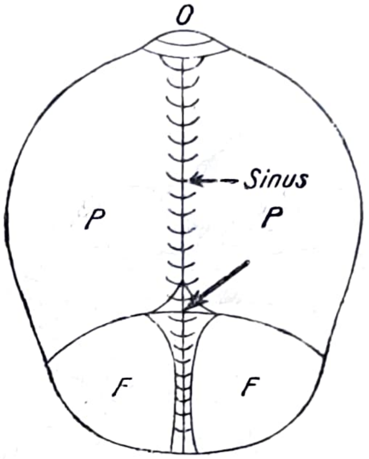


Fig. 246. — Prelevarea sîngelui la copii prin puncție la nivelul fontanelelor.

În cazul în care este indicată și o însămînțare în anaerobioză sîngele este însămînțat în tubul cu bulion glucozat, sau alt mediu anaerob lichid, fiert în prealabil în baie de apă 20 de minute și conținînd ulei de parafină steril.

Pentru examenele serologice, recoltarea sîngelui se face tot prin puncție venoasă. Cantitatea extrasă (circa 10 ml) se pune într-un tub perfect curat, în care sîngele este lăsat să coaguleze, se desprinde apoi cheagul, iar serul transvazat, limpede, este folosit pentru efectuarea diferitelor reacții. Pentru a evita hemoliza sîngelui, care împiedică efectuarea corectă a unui examen serologic, este necesar să folosim, în recoltele pentru examenele serologice, numai seringi uscate, sau dacă au fost sterilizate prin fierbere, este obligatoriu înaintea recoltei să aspirăm în seringă de cîteva ori ser fiziologic steril.

Aceste reacții se practică în diferite perioade din evoluția bolii în raport cu natura acesteia.

Reacțiile de aglutinare, precipitare și fixare a complementului în bolile infecțioase se efectuează numai atunci cînd apar anticorpii în sînge. De exemplu, în febra tifoidă, reacția de aglutinare Widal se efectuează numai din a 7—10-a zi de boală înainte. Reacția de fixare a complementului şi reacţiile de floculare în sifilis se efectuează abia după 14–21 de zile de la apariţia şancrului primar, pentru că în această perioadă încep să apară anticorpii serici.

Pentru unele examene parazitologice şi bacteriologice se face un frotiu în picătură groasă în felul următor :

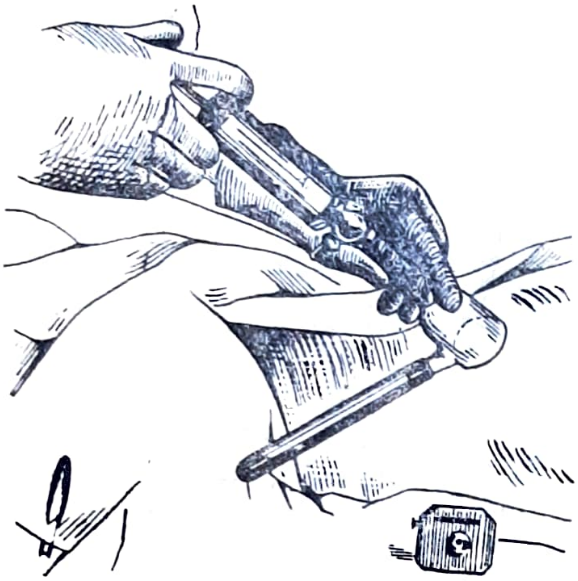


Fig. 247. — Dispozitiv pentru recoltarea sterilă a sîngelui prin ventuză scarificată. Se foloseşte la persoanele lipsite de vene superficiale aparente.

Se aseptizează pulpa unui deget, se înţeapă pielea cu un ac de seringă sterilizată obligatoriu prin fierbere şi se aplică o lamă bine degresată, pentru a se prinde într-un triunghi 3 picături de sînge. Se amestecă circular cu colţul unei alte lame cele 3 picături pentru defibrinare şi aderare de lamă, realizîndu-se o picătură mare, de aproximativ 1 cm diametru.

Se acoperă lamele cu un capac Petri, se lasă să se usuce şi apoi se scrie pe frotiu, cu un creion negru, numele bolnavului şi data. Se împachetează în hîrtie şi se păstrează pentru colorare. Obişnuit se recoltează 2 lame pentru fiecare bolnav.

În acest fel se recoltează sîngele pentru cercetarea hematozoarului palustru, a borelliei febrei recurente, sau pentru reacţia Kudicke-Steuer în tifosul exantematic etc.

Recoltarea sîngelui pentru examenul morfologic comportă : numărătoarea globulelor roşii şi albe şi examenul morfologic al sîngelui pe frotiu în strat subţire. În acest scop se antiseptizează pulpa unui deget sau lobul urechii cu alcool, sau eter şi se puncţionează cu un ac steril. Prima picătură de sînge se şterge, a doua se recoltează apropiind suprafaţa unei lame bine degresate, fără a atinge pielea. Se întinde picătura de sînge pe o altă lamă, dintr-o singură mişcare, într-un strat fin şi uniform. Se usucă repede lama cu frotiul de sînge, prin vînturare. Lamele complet uscate se notează cu creionul negru direct pe frotiu, se învelesc în hîrtie pe care se notează numele bolnavului, data, natura examenului cerut. Pentru viteza de sedimentare a hematiilor, sîngele se recoltează prin puncţie venoasă, cu ajutorul unei seringi de 2 ml, în care se introduc, în prealabil, 0,4 ml dintr-o soluţie sterilă de citrat de sodiu 3,8%, completîndu-se apoi cu 1,6 ml sînge venos. Se agită bine şi se trece într-o pipetă specială, a unui aparat Westergreen.

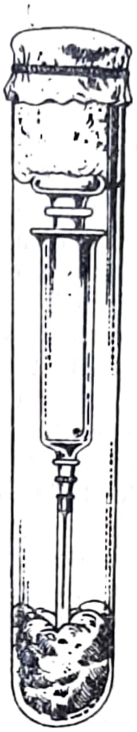


Fig. 248. — Seringă Luer pentru hemocultură montată în dispozitivul de sterilizare.

Exsudatele seroase. Revărsările lichidiene, formate la nivelul diferitelor seroase (pleură, peritoneu, pericard, articulară etc.) se prelevează prin puncţie aseptică, extrăgîndu-se 5–20 ml lichid. Spre a se împiedica coagularea fibrinei, lichidul de puncţie se trece într-un balonaş cu perle de sticlă sterilizat, în care este agitat cel puţin 15 minute pentru defibrinare. După defibrinare, lichidul se centrifughează la 3 000 t/min. iar sedimentul obţinut este folosit pentru examene cito-bacteriologice, iar lichidul de decantare pentru diverse reacţii (Rivalta şi însămînţări).

Lichidul cefalorahidian se recoltează prin puncţie lombară sau occipitală, în condiţii de antisepsie riguroasă, folosindu-se ace speciale (6–10 cm lungime, 1 mm diametru). Puncţia lombară se practică la nivelul spaţiului dintre apofizele spinoase ale L_3, L_4, L_5, pe linia mediană. Se prelevă, în general, circa 5 ml lichid la copil, şi 10 ml la adult. La laborator, lichidul este însămînţat (cîteva picături) pe diferite medii de cultură, iar restul este centrifugat (3 000 t/min.), în vederea examenului citobacteriologic al sedimentului (colorație Gram, May-Grünwald-Giemsa și Ziehl-Neelsen).

Puroiul, format fie la nivelul unui abces rece, fie al unuia banal, se prelevă fie direct cu ansa, dacă este vorba de o colecție deschisă, fie prin puncție și aspirație, dacă avem de-a face cu o colecție închisă. Puroiul din furunculele sau pustulele mici cutanate se recoltează, după prealabilă dezinfecție a suprafeței pielii cu un tampon de alcool, prin deschiderea colecției purulente cu un vaccinostil sau ac de seringă steril și apoi se aspiră o picătură de puroi cu ajutorul unei pipete sterile Pasteur.

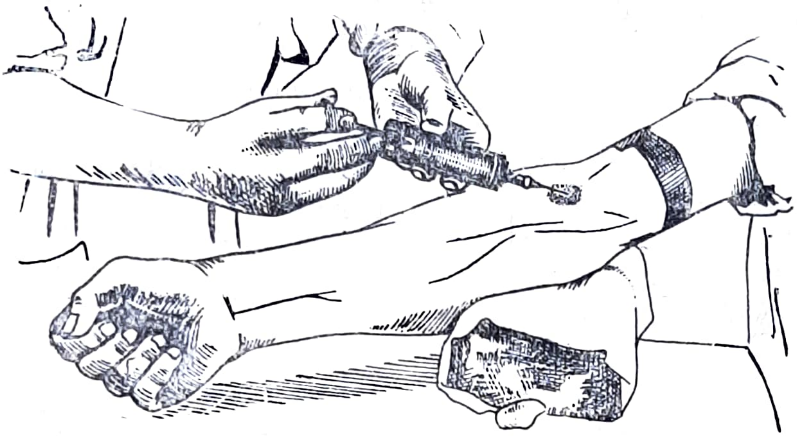


Fig. 249. — Tehnica recoltării sîngelui dintr-o venă din plica cotului.

Dacă puroiul este în cantitate mare, se introduce într-o eprubetă sterilă sau cutie Petri sterilă și se trimite laboratorului, unde se fac însămînțări și frotiuri. Dacă puroiul este în cantitate mică, cum este cazul pustulelor și furunculelor cutanate, însămînțarea trebuie făcută concomitent cu recoltarea. Pipeta Pasteur cu picătura de puroi recoltat se introduce în mediile de cultură, imediat după recoltare.

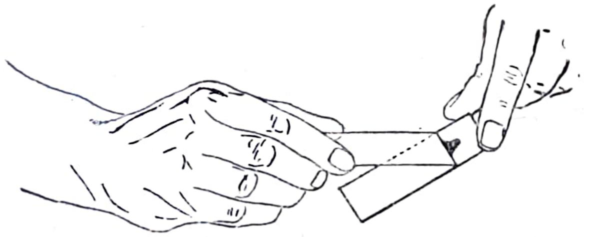


Fig. 250. — Tehnica executării unui frotiu de sînge în strat subțire.

Aspectul macroscopic al puroiului ne dă uneori indicații utile asupra florei microbiene patogene pe care o poate conține. Astfel, un puroi cremos și consistent este de obicei datorit stafilococului, unul grunjos și filant, streptococului, altul, cu miros fetid, indică prezența anaerobilor în floră și în sfîrșit, un puroi de culoare albastră-verde ne amintește de bacilul piocianic.

Secrețiile conjunctivale. Se recoltează la nivelul unghiului intern al ochiului, cu ansa, sau cu un mic tampon steril montat pe o tijă metalică.

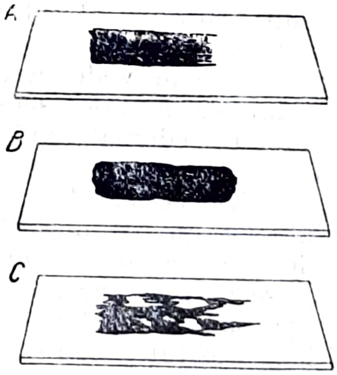


Fig. 251. — Frotiu de sînge în strat subțire.

A—corect executat. *B*—incorect, stratul de sînge prea gros. *C*—incorect, lama nedegresată.

Secrețiile uretrale și vaginale. Se recoltează cu ansa. La bărbat, la nivelul meatului uretral, este preferabil dimineața înainte de urinare. La femei, din uretră și din colul uterin. În cazurile de infecție gonococică cronică este mai bine să se recolteze în primele zile după perioada menstruală. În mod obișnuit se efectuează doar frotiuri pe lamă, dar dacă s-au cerut și culturi, însămînțarea se face pe loc și mediile încălzite în prealabil la 37° sînt duse imediat la laborator, ferindu-le pe cît posibil, de variații de temperatură.

Secrețiile și serozitatea din șancre. Examenul microscopic este indicat numai în primele zile de apariție a șancrului, cu condiția să nu se fi aplicat vreun tratament local cu cel puțin 24 de ore anterior.

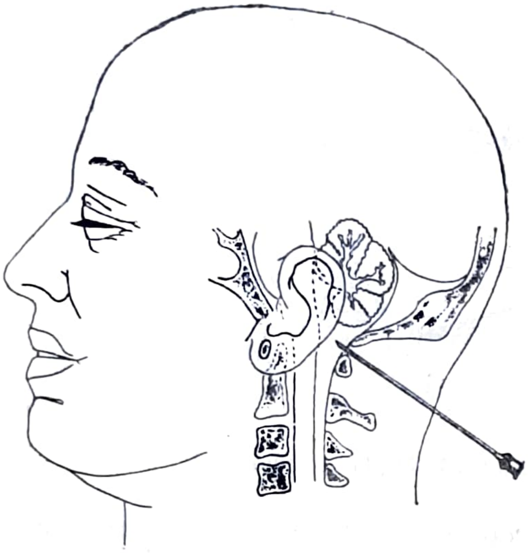


Fig. 252. — Recoltarea lichidului cefalorahidian prin puncție suboccipitală.

Recoltarea se face în vederea unui examen între lamă și lamelă la microscopul cu cîmp întunecat, sau în vederea unui examen pe frotiu-colorat.

Pentru a recolta serozitatea șancrului, se curăță leziunile cu un tampon steril îmbibat în ser fiziologic, apoi se apasă ușor între degete eroziunea, sau se lasă să curgă cîteva picături de eter la suprafața șancrului și se provoacă astfel apariția serozității, care se recoltează cu o pipetă Pasteur fin efilată.

Exsudatele rino-faringiene (difterie, scarlatină, diferite angine și purtători sănătoși). Recoltarea se face cu un tampon de vată hidrofilă montat pe sîrmă sau bețișor de lemn, introdus în tuburi de sticlă sterile. Tampoanele astfel pregătite se sterilizează la căldură uscată, la 160—180°. Exsudatele faringiene se recoltează de obicei de pe amigdalele palatine. Pentru o recoltă corectă, se așază subiectul cu fața spre lumină, se menține limba cu un apăsător de limbă steril și se recoltează cu ajutorul tamponului, ștergînd ușor mucoasa amigdaliană. Cînd există o falsă membrană, căutăm să detașăm un fragment cît mai mic. Dacă bolnavul a făcut gargară sau badijonaj cu antiseptice, recoltarea se va amîna cu 12—24 de ore.

La purtătorii cronici de meningococ, stafilococ, streptococ hemolitic, bacil difteric, cu localizări nazo-faringiene, exsudatul se recoltează, atît din faringe, cît și din nas. Pentru recoltele de pe mucoasa nazală se folosește un tampon de vată mai subțire și montat pe o sîrmă îndoită, astfel ca să putem pătrunde mai ușor în nazo-faringe.

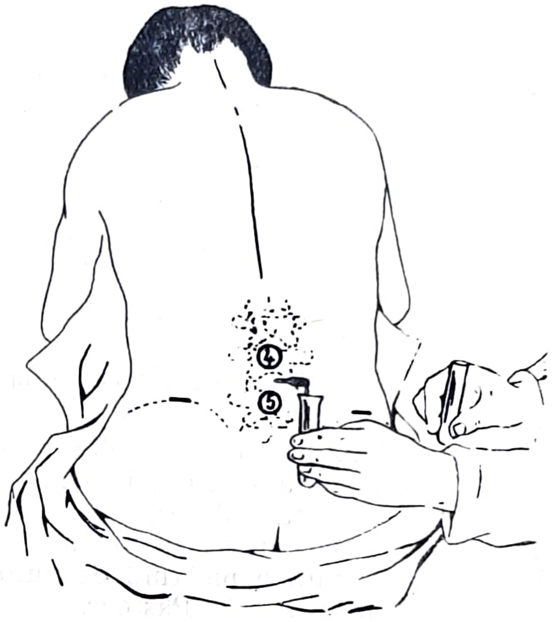


Fig. 253. — Recoltarea lichidului cefalorahidian prin puncție lombară.

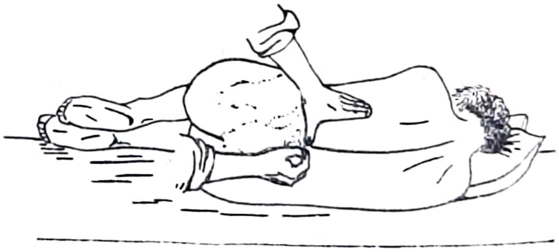


Fig. 254. — Recoltarea lichidului cefalorahidian prin puncție lombară în decubit lateral.

Exsudatele rino-faringiene recoltate trebuie trimise cît mai urgent laboratorului pentru însămînțări. Exsudatele recoltate în vederea depistării purtătorilor de microbi pot fi însămînțate imediat după recoltare în medii de îmbogățire și trimise laboratorului.

Exsudatele bronho-pulmonare. Bolnavii expectorează secrețiile muco-purulente, care sînt eliminate din alveole, bronhii și căile respiratorii superioare, în special dimineața la sculare, cînd s-au acumulat în cantități mai mari în timpul nopții. Expectorația patologică, sputa, se recoltează în recipiente sterile mai ales pentru tuberculoză pulmonară, abcese pulmonare, bronșiectazii și pneumonie.

La copii, deoarece nu știu să expectoreze și înghit sputa, se poate efectua tubaj gastric pentru recoltare, în caz că se suspectează o infecție cu bacili acido-alcoolorezistenți.

În tusea convulsivă se folosesc accesele de tuse caracteristice infecției, pentru a însămînța direct pe placa cu mediul Bordet-Gengou aerosolii de salivă și exsudat, purtători ai microbilor hemofili.

În cazuri speciale recoltarea exsudatelor bronho-pulmonare se poate efectua prin tehnica bronhoscopiei, direct de la nivelul leziunilor, iar culturile din exsudatul recoltat au avantajul că nu mai conțin flora normală a mucoaselor cavităților rino-faringiene și bucale și permit astfel o izolare mai ușoară a agentului etiologic al infecției suspectate.

Însămînțările exsudatelor recoltate prin bronhoscopie trebuie să fie efectuate obligatoriu pe medii aerobe și anaerobe.

Urina pentru uroculturi se recoltează în flacoane curate sterile. La femeie se prelevează aseptic, prin cateterism uretral, cu ajutorul unei sonde metalice sterile. La bărbat, după o prealabilă curățire a meatului uretral, urina se recoltează din a doua jumătate a jetului urinar, după ce uretra a fost spălată de primul jet. Urina recoltată trebuie folosită imediat pentru însămînțări. Dacă acest lucru nu este posibil, ea trebuie conservată la rece, la + 4° ; altfel, datorită prezenței uraților sau fosfaților se tulbură, își modifică pH și dăunează florei microbiene pe care o conține. La examenul direct al sedimentului de centrifugare adeseori se găsesc microbi. Dacă aceștia nu sînt însoțiți de prezența leucocitelor, nu prezintă o semnificație patologică, ci este vorba de un fenomen fiziologic de bacteriurie. Prezența, alături de microbi, a leucocitelor polimorfonucleare frecvente denotă o inflamație de origine infecțioasă a aparatului urinar, o piurie. După cantitatea de leucocite eliminate, în caz de piurie, urina poate fi, din momentul emisiunii, opalescentă sau net tulbure.

În cazul că asistăm la o eliminare de leucocite fără microbi, o piurie aseptică, trebuie să ne gîndim totdeauna la o infecție tuberculoasă și să facem însămînțările și inoculările la cobai.

Adeseori, datorită faptului că bacilii Koch și leptospirele sînt în cantități mici în urină, este nevoie să se recolteze urina bolnavului din 24 de ore. Aceasta se face în vase curate sau sterilizate prin fierbere și ultima emisiune de urină, înainte de împlinirea celor 24 de ore, se colectează într-un vas aparte, pentru ca laboratorul să aibă urină proaspătă, nealterată prin păstrare. În cazul unui rezultat pozitiv pentru bacili Koch, confirmat prin semnele clinice și inocularea la cobai, urina se recoltează din nou, separat, din fiecare rinichi în parte, prin cateterism uretral, într-un serviciu specializat de urologie, pentru a stabili sediul leziunii tuberculoase.

Materiile fecale se recoltează în vederea următoarelor examene : bacteriologic, parazitologic și pentru intoxicațiile de origine alimentară. Pentru examenul bacteriologic, fecalele se recoltează în recipiente speciale sau improvizate, sterilizate, cu condiția să nu conțină dezinfectante. Este de preferat ca materialul recoltat să fie ales din porțiunile cu puroi și mucus sau granule riziforme. Materiile fecale nu trebuie să conțină urină. Cînd materialul patologic trebuie transportat la distanță, recoltarea trebuie făcută în colectoare speciale, închise etanș, cu lichide conservante, sau se efectuează însămînțarea lor la locul de recoltă. Pentru dizenterie este de preferat ca recoltarea să se facă direct din rect, cu ajutorul unei sonde Nélaton introduse adînc, deoarece leziunile în această boală ocupă partea terminală a sigmoidului.

La purtătorii cronici de bacili tifici se administrează în prealabil un purgativ salin care, prin efectele colagoge pe care le determină, mărește posibilitatea de eliminare prin fecale a bacililor cantonați obișnuit în căile biliare.

Pentru examenul parazitologic, materiile fecale se recoltează în vase curate sau colectoare de tip parazitologic și se trimit cît mai curînd laboratorului.

Pentru recoltarea vomismentelor, a produselor de spălătură stomacală, a materiilor fecale și a probelor de alimente, în cazul intoxicațiilor alimentare, indicațiile asupra produselor care trebuie recoltate ni le furnizează ancheta epidemiologică. Vomismentele și lichidele de spălătură stomacală se recoltează în vase curate și sterile. Obligatoriu, aceste produse sînt însoțite și de probe din alimentele incriminate a fi cauza toxiinfecției. Medicul de laborator va face însămînţări şi izolări din produsele patologice în conformitate cu indicaţiile anchetei epidemiologice.

Recoltarea produselor de autopsie de la animalele de laborator infectate experimental se va face cît mai aproape de data morţii. Se prelevează în recipiente sterile şi separate pentru fiecare organ. Se fac hemoculturi prin puncţie cardiacă cu pipeta Pasteur. Din organe cu leziuni specifice se secţionează, cu bisturiu steril, un fragment din interiorul organului. Din ficat, splină, ganglioni limfatici se fac frotiuri prin amprente.

Piesele destinate unui examen histopatologic vor fi introduse în lichid fixator, obişnuit formol comercial 10—20% sau lichid Zenker, Dubosq-Brasil sau Bouin.

BIBLIOGRAFIE

GASTINEL P. — Précis de Bactériologie Médicale, Ediţia a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 206—288.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, Ediţia a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 718—724.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approved Laboratory Techniques, Ed. Appleton-Century, 1945, p. 314—322.

KOLMER A. J. — Clinical Diagnosis by Laboratory Examinations, Ed. Appleton-Century. New-York, 1948, p. 436.

MACKIE J. T., MC CARTNEY E. J. — Handbook of Practical Bacteriology, Ediţia a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburg, 1956, p. 281—329.

POPOVICI MARCELA — Bacteriologie medicală (sub redacţia prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 231—237.

PREDTECENSCHI V. E., BOROVSKAIA V. M., MARGOLINA L. T. — Metode de laborator clinic, Ed. ştiinţifică, Bucureşti, 1953, p. 695.

WHITBY L., HYNES M. — Medical Bacteriology, Ediţia a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 487—506.

METODE DE ÎNSĂMÎNŢARE ŞI IZOLARE A MICROBILOR

Studiul unui microb patogen în vederea stabilirii diagnosticului etiologic al unei infecţii începe o dată cu recoltarea produselor patologice.

Produsul patologic recoltat este supus în laborator unor procedee tehnice, al căror scop final este izolarea şi identificarea microbului patogen din produsul patologic.

Studiul unei bacterii patogene, de la recoltarea produsului şi pînă la identificare, cuprinde următoarele etape de cercetare:

1. Însămînţarea produsului patologic şi izolarea microbului în cultură pură.
2. Cercetarea creşterii pe variate medii de cultură.
3. Stabilirea caracterelor morfologice şi tinctoriale.
4. Cercetarea caracteristicilor biochimice şi de metabolism.
5. Cercetarea structurii antigenice.
6. Cercetarea caracterelor de patogenitate, virulenţa şi toxinogeneza *in vitro* şi *in vivo*, prin realizarea infecţiei experimentale la animalele de laborator.

ÎNSĂMÎNŢAREA ŞI IZOLAREA MICROBILOR

Însămînţarea se realizează obişnuit prin introducerea unei porţiuni, de obicei foarte reduse, din produsul patologic, într-un mediu de cultură apreciat ca favorabil speciei microbiene pe care urmărim s-o cultivăm. Însămînţarea se face în condiţii de asepsie, la flacăra becului de gaz sau în hote sterilizate cu raze ultraviolete, cu ajutorul ansei de platină, pipetei Pasteur, tampon de vată etc., în medii lichide sau solide, uzuale şi speciale.

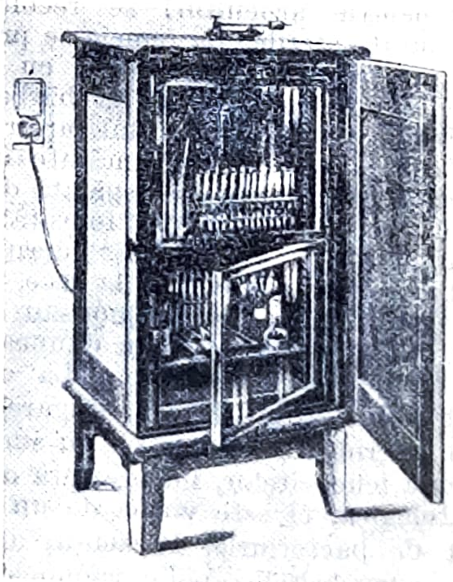


Fig. 255. — Dulap termostat electric reglabil.

Prin însămînțarea simplă obținem, în general, o creștere masivă bacteriană pe mediul de cultură. Cele mai deseori însă însămînțarea se face în anumite condiții, pentru a realiza simultan, atît creșterea bacteriilor, cît și izolarea lor sub forma de colonii bine individualizate. În cazul unor anumite specii microbiene, tehnica simultană a însămînțării și izolării pe medii speciale de cultură ne îngăduie și o identificare parțială.

TEHNICA ÎNSĂMÎNȚĂRII SIMPLE

Pentru a evita introducerea în mediile de cultură a altor germeni decît cei aflați în produsul patologic, se iau următoarele precauții :

– se flambează ansa sau pipeta și se așteaptă să se răcească înainte de a fi încărcată cu produsul de însămînțat ;

– se deschide apoi eprubeta sau colectorul cu produsul patologic și se flambează orificiul ;

– se introduce în eprubetă firul de platină sau pipeta și se încarcă cu o picătură de produs ;

– se flambează din nou orificiul eprubetei și se închide ;

– se deschide și se flambează orificiul tubului cu mediul de cultură, se introduce ansa cu pipeta încărcată și se face însămînțarea ;

– se flambează și se închide tubul însămînțat ;

– se flambează firul de platină, iar pipeta care a slujit la însămînțare se așază în sublimat $1^0/_{00}$ sau amestec oxidant sulfocromic.

Însămînțarea se poate face în medii lichide sau solide.

În medii *lichide* se însămînțează cu pipeta Pasteur, cu ansa sau uneori, cum este în cazul unei hemoculturi, direct cu seringa sau cu acul montat direct la recipientul în care s-a recoltat sîngele.

Pe medii *solide*, geloză înclinată, plăci Petri cu geloză, geloză-sînge, ser coagulat etc., însămînțarea se face cu ansa sau direct cu tamponul de vată cu care s-a recoltat produsul patologic. În geloza dreaptă însămînțarea se face în profunzime, prin înțepătură, sau cu pipeta Pasteur, după topirea și răcirea la 45–47° a gelozei.

Însămînțarea în medii anaerobe se practică după metoda însămînțării în medii lichide, respectînd unele precauții speciale.

Însămînțarea și izolarea bacteriilor se realizează prin 2 grupuri de metode : generale și speciale.

Metode generale

Metoda diluțiilor succesive în medii lichide. O porțiune din produsul patologic se diluează în bulion, apă peptonată, geloză sau gelatină lichefiată. Această operație se face cu o pipetă Pasteur sau cu ansa, în caz că produsul patologic este lichid, lăsînd să curgă o picătură din pipetă sau o picătură din ochiul ansei într-un tub cu mediu. Din acest tub însămînțat se trece tot o picătură în al doilea tub, și astfel se repetă operația de diluție în 6–8 tuburi succesive. În cazul că în produsul patologic au existat 2 specii microbiene, de pildă un coc și un bacil, după un număr de diluții vom obține creșterea în colonii separate a cocilor și bacililor. O altă tehnică a diluțiilor succesive din produsul patologic se poate realiza în felul următor : o porțiune din produsul patologic se diluează succesiv într-un număr de 8–10 tuburi cu ser fiziologic steril, cu ajutorul unei pipete Pasteur, aspirînd și respingînd lichidul din fiecare tub, pentru a realiza o suspensie omogenă a microbilor în lichidul de diluție. Din fiecare diluție, începînd cu cea mai mare, se ia 1 ml de lichid cu o pipetă sterilă de 1 ml și se repartizează într-o cutie Petri sterilă. În fiecare cutie Petri se toarnă apoi steril, un tub cu geloză nutritivă topită și răcită la 45–47°. Se amestecă prin agitarea circulară a cutiei Petri în ambele sensuri, apoi se lasă se se solidifice geloza. După 24 de ore de incubare la

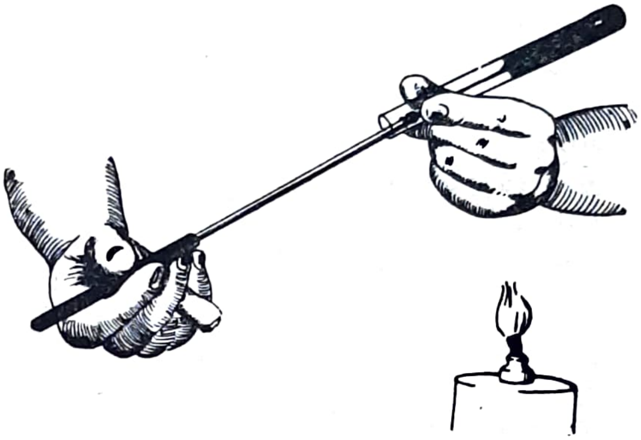


Fig. 256. — Tehnica însămînțării prin înțepătură cu ansa în geloza dreaptă.

termostat, se obţin în cîteva din seria de plăci Petri colonii izolate, distanţate între ele, ceea ce denotă izolarea în cultură pură a speciei sau speciilor microbiene din produsul patologic.

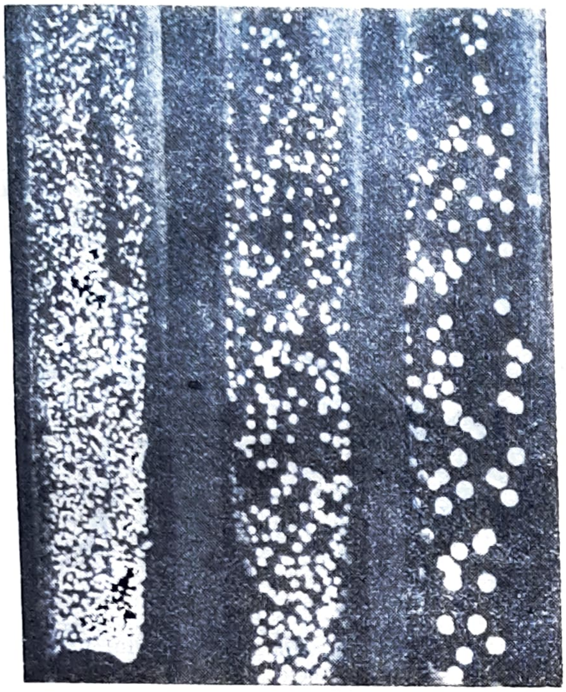


Fig. 257. — Tehnica obţinerii de colonii izolate prin diluţii succesive în lichidul de condensare în tuburi cu geloză înclinată.

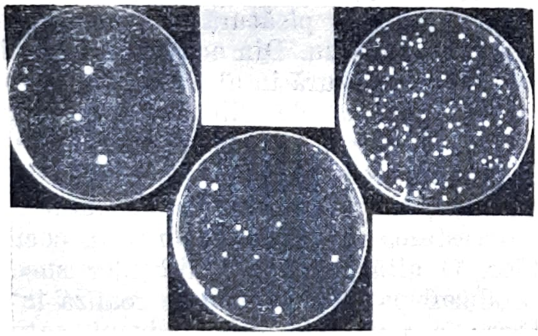


Fig. 258. — Tehnica obţinerii de colonii izolate prin diluţii în ser fiziologic şi însămînţare în plăci Petri cu geloză.

Metoda diseminării produsului patologic pe medii solide. Se folosesc de obicei ca medii solide geloza înclinată, serul coagulat sau geloza-sînge în cutii Petri. Ansa bacteriologică încărcată cu produsul patologic se descarcă succesiv, pînă la epuizare, pe suprafaţa mediului solid, de obicei prin mişcări în zig-zag. Se pot folosi succesiv 3—5 tuburi cu geloză înclinată sau 2 plăci Petri.

Cînd însămînţarea se face cu tamponul cu exsudat pe suprafaţa unei plăci Petri cu geloză-sînge, se obişnuieşte să se descarce tamponul prin mişcări scurte de şerpuire, pe direcţia unei raze a plăcii cu mediu, şi apoi, cu ajutorul unei baghete sterile de sticlă, în formă de „L", care se aplică pe linia de însămînţare, se face izolarea prin diseminare, descărcînd succesiv bagheta printr-o mişcare uniformă de rotaţie pe toată suprafaţa mediului. După 24 de ore coloniile izolate se vor dezvolta, bine individualizate, diseminate pe suprafaţa mediului la o anumită distanţă de însămînţarea iniţială, unde creşterea rămîne difuză.

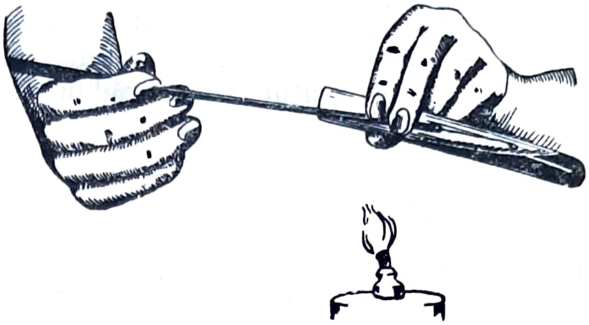


Fig. 259. — Tehnica însămînţării produsului patologic cu ansa pe geloză înclinată.

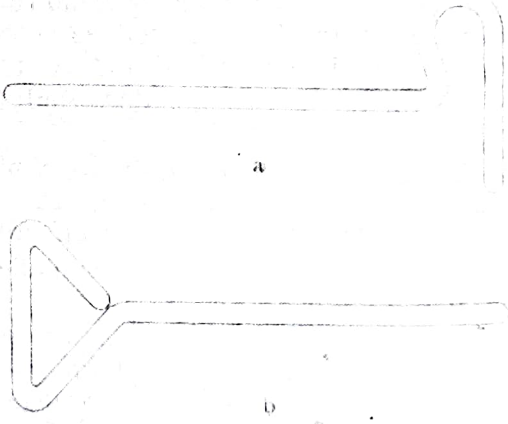


Fig. 260. — Tipuri de baghetă în „L" pentru însămînţarea exsudatelor pe geloză-sînge în placă Petri.

Metoda asocierii diluţiilor succesive cu diseminarea produsului patologic. Reprezintă o metodă economică, frecvent întrebuinţată, care se aplică la mediul cu geloză înclinată sau ser coagulat. Produsul patologic care trebuie însămînțat se încarcă în ochiul ansei bacteriologice, se introduce și se diluează în lichidul de condensare al unui tub cu mediu, apoi se însămînțează, prin epuizarea ansei prin mișcări în zig-zag pe suprafața gelozei. Se ia în continuare o picătură din lichidul de condensare al primului tub, se diluează în lichidul de condensare al unui al doilea tub și se însămînțează, prin epuizarea ansei pe suprafața gelozei înclinate.

Se procedează analog pe 5 tuburi cu mediu și cu siguranță că în tubul nr. 4 sau nr. 5 obținem colonii izolate distanțate.

Metode speciale

Aceste metode se întrebuințează atunci cînd datele clinico-epidemiologice ne dau indicații asupra speciei microbiene care trebuie izolată. Metodele speciale de izolare ne îngăduie și o identificare parțială a speciei microbiene izolate, deoarece evidențiază anumite caracteristici de metabolism.

Metodele de izolare prin adaos de substanțe bacteriostatice. Adăugarea în mediul de cultură a unor compuși chimici cu acțiune bacteriostatică sau bactericidă, sau tratarea produsului patologic cu asemenea substanțe înaintea însămînțării, au drept scop, să inhibe flora de asociație și să creeze condiții preferențiale de dezvoltare speciei microbiene pe care dorim s-o izolăm. De pildă, verdele briliant, selenitul de Na, tetrationatul de Na favorizează creșterea microbilor din genul *Salmonella* și inhibă microbii din flora de asociație intestinală. Teluritul de K este metabolizat de bacilul difteric și facilitează dezvoltarea lui în mediile de cultură cu telurit; în acelaș timp, inhibă flora de asociație din rino-faringe, care se găsește în număr mare în tamponul cu exsudat faringian și stingherește adeseori izolarea bacilului difteric. Acidul sulfuric, hidratul de Na și antiformina, substanțe bactericide, distrug flora de asociație dintr-un produs patologic cu bacili tuberculoși și permit, după neutralizare, însămînțarea și izolarea bacilului tuberculos în condiții mult mai bune.

Fenolul, în concentrațiile obișnuite, este suficient pentru a inhiba creșterea florei de asociație dintr-un produs patologic, dar nu afectează dezvoltarea anaerobilor patogeni și enterococului, ci le favorizează creșterea. Clorura de Na, adăugată în proporție mare în mediile hiperclorurate, inhibă dezvoltarea florei de asociație din exsudatele rino-faringiene și nazale, permițînd astfel o creștere și izolare favorabilă stafilococului patogen și enterococului. Antibioticele înglobate în anumite proporții în medii de cultură inhibă înmulțirea microbilor sensibili și favorizează astfel dezvoltarea speciilor rezitente la antibiotice. Pentru izolarea *B. pertussis* se folosește adăugarea de penicilină la mediul de izolare Bordet-Gengou; microbul nefiind sensibil la penicilină, nu este stînjenit în dezvoltare, ci dimpotrivă, favorizat prin inhibarea florei de asociație sensibilă la penicilină.

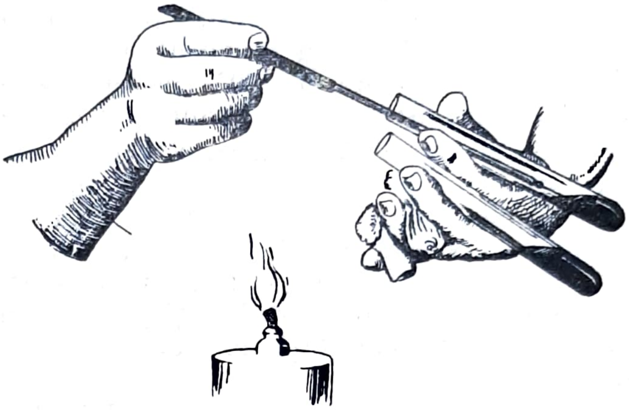


Fig. 261. — Tehnica însămînțării în subcultură dintr-o colonie izolată pe geloză înclinată, pentru obținerea microbului în cultură pură.

Metode de izolare și identificare bazate pe evidențierea anumitor caractere enzimatice. Reprezintă metodele cele mai des întrebuințate pentru izolarea și identificarea bacteriilor patogene. De pildă, colibacilul care se dezvoltă pe mediile cu lactoză fermentează lactoza, cu producere de acid. Un indicator de pH, turnesolul sau albastrul de bromtimol, adăugat în mediu, pune în evidență producerea acidului, prin virarea mediului în roșu sau galben. Microbii din genurile *Salmonella* și *Shigella*, care nu au putere fermentativă asupra lactozei, nu produc acid și deci, nu modifică culoarea mediului.

Streptococul hemolitic și stafilococul patogen produc hemoliză totală pe mediile cu sînge, datorită elaborării hemolizinelor caracteristice.

Metodele de izolare și identificare prin folosirea atmosferei cu adaos de CO_2 și anaerobioză sînt întrebuințate pentru izolarea germenilor care necesită prezența CO_2 sau a microbilor strict anaerobi care au ca scop înlăturarea oxigenului liber din mediile de cultură și menținerea anaerobiozei.

Metode de izolare și identificare utilizînd medii cu un anumit pH. De exemplu, vibrionul holeric preferă o zonă alcalină de dezvoltare. Apa peptonată la un pH aproape de 9 favorizează astfel, izolarea vibrionului holeric.

Metode de izolare care folosesc căldura. Prin încălzire la 80°, timp de 10 minute, microbii sporulaţi sînt izolaţi de cei nesporulaţi. Formele vegetative ale microbilor nesporulaţi se distrug toate la temperatura de 80°, pe cînd sporii formelor sporulate rezistă şi germinează ulterior.

Metode biologice de izolare. Ele constau în inocularea microbului de cercetat la animalele sensibile de laborator. Animalele mai frecvent folosite în acest scop sînt : iepurele, cobaiul şi şoarecele alb. Animalul se alege în raport cu produsul de inoculare şi în funcţie de sensibilitatea speciei animale faţă de o anumită specie microbiană.

Spre exemplu, cobaiul este animalul de elecţie pentru infecţia tuberculoasă, difterie şi cărbune ; şoarecele alb pentru pneumococ, *Klebsiella* etc. Produsele patologice, care se inoculează animalelor de laborator, pot fi foarte variate : spută, exsudate faringiene, pleurale sau peritoneale, lichid cefalorahidian, sînge, urină etc. sau sub formă de suspensie dintr-o cultură microbiană sau dintr-un filtrat de cultură.

Căile de inoculare la animale pot fi : percutană, intradermică, subcutană, intramusculară, intravenoasă, intraperitoneală, intracerebrală şi prin instilaţii oculare şi nazale. Cel mai des întrebuinţate sînt : calea subcutană, intraperitoneală şi intravenoasă. Inocularea subcutană se face sub pielea abdomenului sau pe flancuri, la cobai şi iepure, iar la şoarece sub pielea spatelui, după aseptizarea regiunii. Calea subcutană se foloseşte în cazurile în care vom avea de-a face cu un produs patologic care, în afară de agentul patogen incriminat, mai conţine şi floră de asociaţie, de pildă spută, pentru izolarea pneumococului. Această cale permite o izolare uşoară a pneumococului ; ceilalţi microbi rămîn la locul de inoculare.

Inocularea intraperitoneală poate fi folosită ori de cîte ori produsul patologic inoculat conţine o floră monomicrobiană, ca de pildă sînge, lichid cefalorahidian etc. Ea reprezintă o cale rapidă de izolare şi identificare.

Inocularea intravenoasă se practică la iepuri în vena marginală a urechii, iar la şoarece, în vena dorsală a cozii.

Inocularea intramusculară se foloseşte şi în scopul evidenţierii leziunilor histolitice experimentale în gangrena gazoasă.

În majoritatea cazurilor animalele inoculate, urmărite în timpul bolii, se sacrifică în plină boală sau mor în urma infecţiei sau intoxicaţiei căpătate. Orice animal inoculat trebuie ţinut sub observaţie, iar la autopsierea lui este necesar să se facă hemoculturi şi însămînţări din organe şi umori. Scopul autopsiei constă deci, în cercetarea şi izolarea microbului patogen inoculat şi observarea leziunilor anatomopatologice macro- şi microscopice caracteristice.

EXAMENUL CARACTERELOR DE CULTURĂ ALE MICROBILOR

Dezvoltarea microbilor în mediile de cultură îmbracă aspecte variate ; dintre acestea, cele mai des întîlnite pot constitui caractere de identificare pentru multe specii microbiene şi pot fi rezumate după cum se vede mai jos.

La microbii aerobi :

a) *În medii lichide* pot apărea următoarele aspecte :

— mediul este tulbure omogen (stafilococ, *Salmonella* etc.) ;

— mediul este clar în cele două treimi superioare, cu depozit grunjos sau nisipos pe pereţi şi la fundul tubului (streptococ) ;

— mediul este clar, cu depozit floconos şi aderent la fundul tubului (bacilul cărbunelui) ;

— mediul prezintă văl subţire la suprafaţă (bacil difteric, vibrion holeric etc.) ;

— membrana uscată, scuamoasă la suprafaţa mediului (*B. subtilis*) ;

— membrana groasă, rugoasă, plisată la suprafaţă, restul mediului limpede (bacilul tuberculos) ;

— inel aderent de pereţii tubului (colibacil) ;

—apariţie de bule de gaz în interiorul mediului. Miros caracteristic :aromat (bacilul piocianic), fecaloid (colibacil), corn ars (bacilul tetanic) ;

— mediul este colorat diferit : verde-albăstrui (bacilul piocianic).

b) *Pe medii solide* morfologia coloniilor poate fi extrem de variată ; se notează, în primul rînd, dacă aspectul general al coloniilor este uniform sau nu, pe toată suprafaţa mediului. Deci se notează :

— uniformitatea coloniilor ;

— mărimea coloniilor ;

— forma coloniilor (rotunde, ovalare, stelate etc.) ;

— aspectul marginilor (regulate, neregulate, cu prelungiri în cap de meduză, fenomenul de invazie etc.) ;

– suprafaţa coloniei: bombată, granulară, plată cu depresiune centrală (ombilicată), cu ridicătură centrală (mamelonată), cu ridicătură marginală etc.;

– aspectul (lucios, mat, mucoid, aspect granulos, uleios, vitros etc.);

– consistenţa coloniei (vîscoasă, filantă, friabilă);

– dacă se emulsionează uşor sau nu în ser fiziologic;

– transparenţa sau opacitatea coloniei;

– pigmentarea coloniei;

– apariţia unei zone colorate sau incolore în jurul coloniei;

– eventuala lichefiere a mediului cu gelatină (proteoliza);

– apariţia zonelor de liză într-o cultură densă.

La *microbii anaerobi*, însămînţările în medii semisolide în tuburi Weinberg cu geloză Veillon pot oferi aspecte variate de creştere ale coloniilor izolate:

— colonii mici lenticulare (forme imobile);

— colonii pufoase difuze (forme mobile);

— apariţia de bule de gaz în masa mediului;

— fragmentarea şi ruperea mediului prin formarea masivă de gaze;

— lichefierea parţială sau totală a mediului.

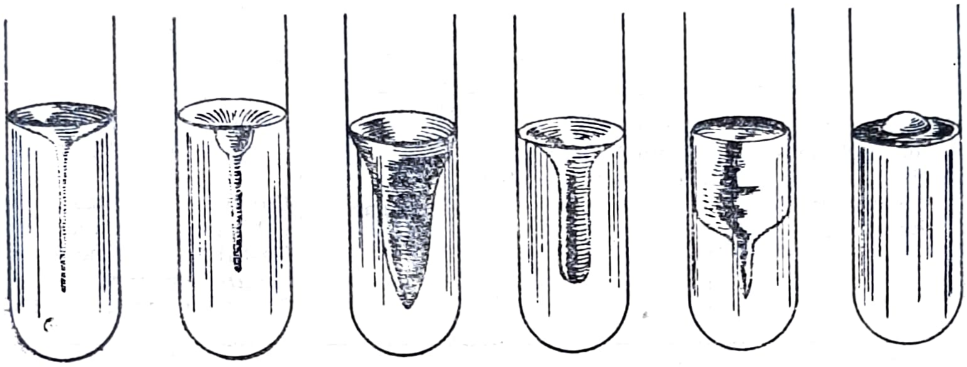


Fig. 262. — Modalităţi de creştere a bacteriilor proteolitice în gelatină.

Pe mediile cu sînge creşterea anaerobilor este foarte variată şi polimorfă. Coloniile se pot însoţi sau nu de hemoliză.

Flora anaerobă netelurică dezvoltă de obicei colonii mici, ca picăturile de rouă, nehemolitice, cu excepţia speciei *Sferoforus funduliformis* care dezvoltă colonii mici rotunde înconjurate de o zonă de hemoliză.

Flora anerobă telurică dezvoltă colonii hemolitice cu polimorfism accentuat de la coloniile mici punctiforme pînă la formele dantelate şi în arabescuri.

TABELUL 93

Caracteristicile de creştere ale bacililor Gram-pozitiv pe mediul cu geloză-sînge

Forma coloniei	Morfologia microbului	Medii indicate pentru subculturi	Mobilitate	Metode de orientare imediată	Clasificarea probabilă
Colonii mari, plate, cu marginile neregulate, nehemolitice	Bacili mari cu capetele drepte, sporulaţi, aşezaţi izolat sau în lanţuri Gram-pozitiv, capsulă	Plăci cu bulion agar 2 %; creştere caracteristică în cap de meduză Proteoliza în gelatină Agar 3 % pentru sporulaţie	Negativ	Prezenţa capsulei Colonii în cap de meduză Septicemie la şoarecele alb	*B. Anthracis*
Colonii plate, cu marginile neregulate, frecvent hemolitice	Bacili de dimensiuni variabile, sporulaţi, izolaţi sau în lanţuri, fără capsulă	Plăci cu bulion agar 2 % Bulion simplu	Pozitiv	Absenţa capsulei Absenţa patogenităţii pentru şoarece	*B. cereus* (*pseudoanthracis*) *B. mycoides, megatherium, B. subtilis* *B. mesentericus*

TABELUL 93 (continuare)

Forma coloniei	Morfologia microbului	Medii indicate pentru subculturi	Mobilitate	Metode de orientare imediată	Clasificarea probabilă
Colonii opace, bombate, lucioase, cu marginile regulate. Absența hemolizei	Bacili pleomorfi, Gram-pozitiv, cu corpusculi Babeș-Ernst	Clauberg Gundel-Tietz Fergussen pentru uree ază	Negativ	Colorația Gram și pentru corpusculii Babeș-Ernst Toxinogeneza *in vitro* Elek, pozitivă Colonii negre cu halo albastru pe Clauberg Testul ureazei, negativ	*C. diphtheriae*
Colonii opace, mici, cu marginile regulate. Absența hemolizei	Bacili scurți, pleomorfi, Gram-pozitivi, uneori cu corpusculi Babeș-Ernst	Clauberg Gundel-Tietz Fergussen pentru urează	Negativ	Colorație Gram și pentru corpusculii Babeș-Ernst Colonii fără halo albastru pe Clauberg Testul toxinogenezei *in vitro*, negativ Testul ureazei, pozitiv	*C. Hoffmanni* și alți difterimorfi

TABELUL 94

Caracteristicile de creștere ale bacililor Gram-negativ pe mediul cu geloză-singe

Forma coloniei	Morfologia microbului	Medii indicate pentru subculturi	Mobilitate	Metode de orientare imediată	Clasificarea probabilă
Colonii mari, opace, cu marginile netede sau neregulate, cu suprafața lucioasă sau rugoasă	Bacili scurți, Gram-negativ, uneori încapsulați	Bulion agar 2%	Pozitiv	Identificarea serologică din culturile de 18–24 de ore pe geloză înclinată cu seruri aglutinante polivalente de grup și tip	Grupul *coli*, *Salmonella-Shigella*
Colonii mari, bombate, opace, cu aspect viscos, mucoid, cu marginile regulate	Bacili scurți, Gram-negativ, încapsulați	Bulion agar 2%	Negativ	Identificare serologică cu seruri anticapsulare Septicemie la șoarecele alb	Grupul *Klebsiella*
Colonii mari, opace, plate cu tendința la creștere rapidă, cu degajare de gaze, cu miros de putrefacție	Bacili scurți, pleomorfi, Gram-negativ	Bulion agar 2%	Pozitiv	Realizarea fenomenului de invazie și de demarcație pe placă cu agar 2%	Grupul *Proteus*
Colonii extrem de mici, umede, lucioase, care se dezvoltă lent	Bacili subțiri, pleomorfi, Gram-negativ	Geloză-singe șocolat, sau Bordet-Gengou	Negativ	Reproducerea fenomenului de satelitism Testul intradermic la cobai pentru deosebirea bordetelei de *H. influenzae*	Grupul *Haemophilus* și *Bordetella*
Colonii mici, rotunde opace, pigmentate galben	Bacili scurți, Gram-negativ	Cartof glicerinat, bulion-agar 2% glicerinat	Negativ	Reproducerea fenomenului Strauss la cobai	Grupul *Malleomyces mallei*

TABELUL 94 (continuare)

Forma coloniei	Morfologia microbului	Medii indicate pentru subculturi	Mobilitate	Metode de orientare imediată	Clasificarea probabilă
Colonii mici, rotunde, cu margini regulate	Cocobacili, Gram-negativ, uneori de formă ovalară	Geloză ficat sau geloză-sînge	Negativ	Testul comportării față de fucsină și tiozină Testul producerii de H_2S	Grupul *Brucella*
Colonii mici, transparente cu margini neregulate, care se dezvoltă lent	Cocobacili, de formă ovalară, pleomorfi, Gram-negativ; colorație bipolară cu fucsină sau tionină; uneori se întîlnesc forme încapsulate	Bulion agar 2%, medii cu ou și sînge (Fancisc, Mc Coy și Condrea)	Negativ	Pleomorfism și colorație bipolară cu tionină Inoculare la șoarece	Grupul *Pasteurella*

TABELUL 95

Caracteristicile de creștere ale cocilor Gram-negativ pe mediul cu geloză-sînge

Forma coloniei	Morfologia microbului	Medii indicate pentru subculturi	Metode de orientare imediată	Clasificarea probabilă
Mari, opace, rotunde, cu marginile regulate	Coci izolați și în grămezi, fără capsulă, gram-pozitivi	Bulion-agar 2%, înclinat în tuburi sau turnat în plăci	Dezvoltarea pigmentului — alb ca porțelanul — galben auriu — galben citrin	*Staphilococcus albus* *Staphilococcus aureus* *Staphilococcus citreus*
Rotunde, lucioase, cu aspect viscos, umed, cu marginile netede, regulate	Coci grupați în tetrade, Gram-pozitiv	Bulion-agar 2%, înclinat în tuburi sau turnat în plăci	Așezare caracteristică în tetrade	*Gaffkya tetragena*
Colonii mici, cu marginile regulate, de 1 mm Ø, înconjurate de o zonă de hemoliză incompletă de tip alfa	Coci lanceolați în diplo sau lanțuri scurte. De obicei încapsulați și Gram-pozitiv	Bulion glucozat TIEM Mediul Hiss cu inulină	Culturile solubile în bilă sau săruri biliare Fermentează inulina	*Pneumococcus*
Colonii mici, punctiforme, rotunde, cu zonă de hemoliză incompletă de tip alfa	Coci rotunzi izolați, în perechi sau în lanțuri scurte. Fără capsulă, Gram-pozitiv	Bulion glucozat TIEM Mediul Hiss cu inulină	Culturile insolubile în bilă și săruri biliare Nu fermentează inulina	*Streptococcus viridans* (alfa)
Colonii mici, punctiforme, rotunde, cu zonă de hemoliză completă de tip beta	Coci rotunzi, izolați, în perechi sau în lanțuri scurte. Fără capsulă, Gram-pozitiv	Bulion glucozat TIEM Mediul Hiss cu inulină	Culturile insolubile în bilă și săruri biliare Nu fermentează inulina	Streptococul hemolitic (beta)
Colonii de dimensiuni variate, opace, rotunde, nehemolitice	Coci ovalari, izolați sau în perechi. Fără capsulă, Gram-pozitiv	Bulion cu adaos de 10% bilă. Bulion hiperclorurat 6,5% ClNa și pH 9,6	Crește pe mediile cu bilă, streptococii sînt inhibați Se dezvoltă pe mediile hiperclorurate la pH alcalin Streptococii sînt inhibați Absența hemolizei	*Streptococcus faecalis* (enterococ)

BIBLIOGRAFIE

GASTINEL P. — Précis de Bactériologie Médicale, Ediţia a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 191—197.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, Ediţia a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 623—651.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approved Laboratory Techniques, Ed. Appleton-Century, 1945, p. 364—372.

MACKIE J. T., MC CARTNEY E. J. — Handbook of Practical Bacteriology, Ediţia a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 53—83.

POPOVICI MARCELA — Bacteriologie medicală (sub redacţia prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 221—228.

TOPLEY and WILSON'S — Principles of Bacteriology and Immunity, Ediţia a 4-a vol. I, Ed. Edward Arnold, Londra, 1955, p. 433—440.

WHITBY L. , HYNES M. — Medical Bacteriology, Ediţia a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 34—51.

METODE IMUNOLOGICE DE DIAGNOSTIC

Reacţiile antigen-anticorp sînt folosite la studiul bolilor infecţioase în scop diagnostic. Reacţiile antigen-anticorp sînt specifice; anticorpul are afinitate numai pentru antigenul în prezenţa căruia a luat naştere, iar antigenul nu fixează, dintr-un ser care conţine mai mulţi anticorpi, decît pe acela care îi corespunde. Datorită acestui fapt se poate pune în evidenţă, cu ajutorul unui anticorp dintr-un ser imun, cunoscut, prezenţa antigenului microbian corespunzător, sau invers, cu ajutorul unui antigen cunoscut se poate evidenţia prezenţa sau absenţa anticorpului specific corespunzător dintr-un ser de cercetat.

Reacţiile antigen-anticorp, curent utilizate astăzi în practica medicală, sînt: aglutinarea, precipitarea, neutralizarea, imunocitoliza şi fixarea complementului.

Forma de apariţie a acestor fenomene este condiţionată de natura antigenului, nu de aceea a anticorpului.

— Dacă antigenul este o suspensie de particule microbiene, microbii apar strînşi unii lîngă alţii, aglutinaţi = *reacţie de aglutinare.*

— Dacă antigenul este o soluţie coloidală, formată din particule fine, sub acţiunea anticorpului, acestea ies din soluţie şi se depun sub forma unui precipitat = *reacţie de precipitare.*

— Dacă antigenul este alcătuit din particule lizabile, corpi microbieni sau hematii şi dacă reacţia se face în prezenţa *complementului,* se produce imunocitoliza, o bacterioliză sau hemoliză sub acţiunea anticorpului specific şi în prezenţa *alexinei.*

— Dacă antigenul este o substanţă toxică, o toxină microbiană, acţiunea ei toxică asupra ţesuturilor poate fi neutralizată = *reacţie de neutralizare.*

Toate aceste tipuri de reacţii antigen-anticorp pot fi puse în evidenţă astfel:

— *in vitro* = aglutinarea şi precipitarea;

— *in vitro* şi *in vivo* = bacterioloza şi hemoliza;

— numai *in vivo* = neutralizarea toxinelor.

REACŢIA DE AGLUTINARE

Fenomenul aglutinării la bacterii, adică alipirea şi aglomerarea bacteriilor sub acţiunea unui ser care conţine anticorpi specifici, a fost observat încă din 1890, de către Ilia Mecinikov, iar mai tîrziu, studiat de către Gruber, Durham, Ivanov, Issaev şi aplicat la diagnosticul febrei tifoide de către Widal.

În urma pătrunderii microbilor patogeni în organism, sau după imunizare pe cale artificială a organismului cu microbi omorîţi sau cu toxine microbiene (antigene), apar în organism substanţe specifice de apărare, denumite anticorpi. Definiţiile antigenului şi anticorpului pot fi formulate astfel:

Antigenele sînt substanţe care, stimulează producerea în organism a anticorpilor, cu care reacţionează specific.

Anticorpii sînt substanţe care apar în organism datorită stimulului realizat de prezenţa antigenului în ţesuturi. Ei reacţionează şi se combină specific numai cu antigenul care le-a dat naştere.

Mecanismul aglutinării. Jules Bordet a arătat că aglutinarea apare numai în prezenţa electroliţilor de Na şi se desfăşoară în două faze:

Prima fază este reprezentată de unirea specifică a antigenului cu anticorpul corespunzător, realizîndu-se complexul antigen-anticorp.

Faza a doua constă în aglomerarea şi alipirea complexelor iniţiale antigen-anticorp, determinată de prezenţa electroliţilor (ClNa) şi transformarea lor în complexe secundare, vizibile cu ochiul liber sau la aglutinoscop. Faza a doua este nespecifică, constituind un fenomen pur fizico-chimic.

Bacteriile sînt menţinute în suspensie, neaglutinate, sub influenţa a două forţe antagoniste: o forţă de atracţie, care tinde să aglomereze particulele şi o forţă de repulsie, care rezultă din încărcătura electrostatică şi din hidratarea particulelor.

Atît timp cît forţele de repulsie sînt mai mari decît cele de atracţie, suspensia este stabilă şi particulele rămîn separate. Aglutinarea imună se petrece prin mecanismul următor :

1. Anticorpul specific, prin combinarea cu particulele de antigen corespunzător, neutralizează parţial încărcătura electronegativă a acestora şi reduce aviditatea lor pentru apă. În felul acesta forţele de repulsie dintre particule scad.

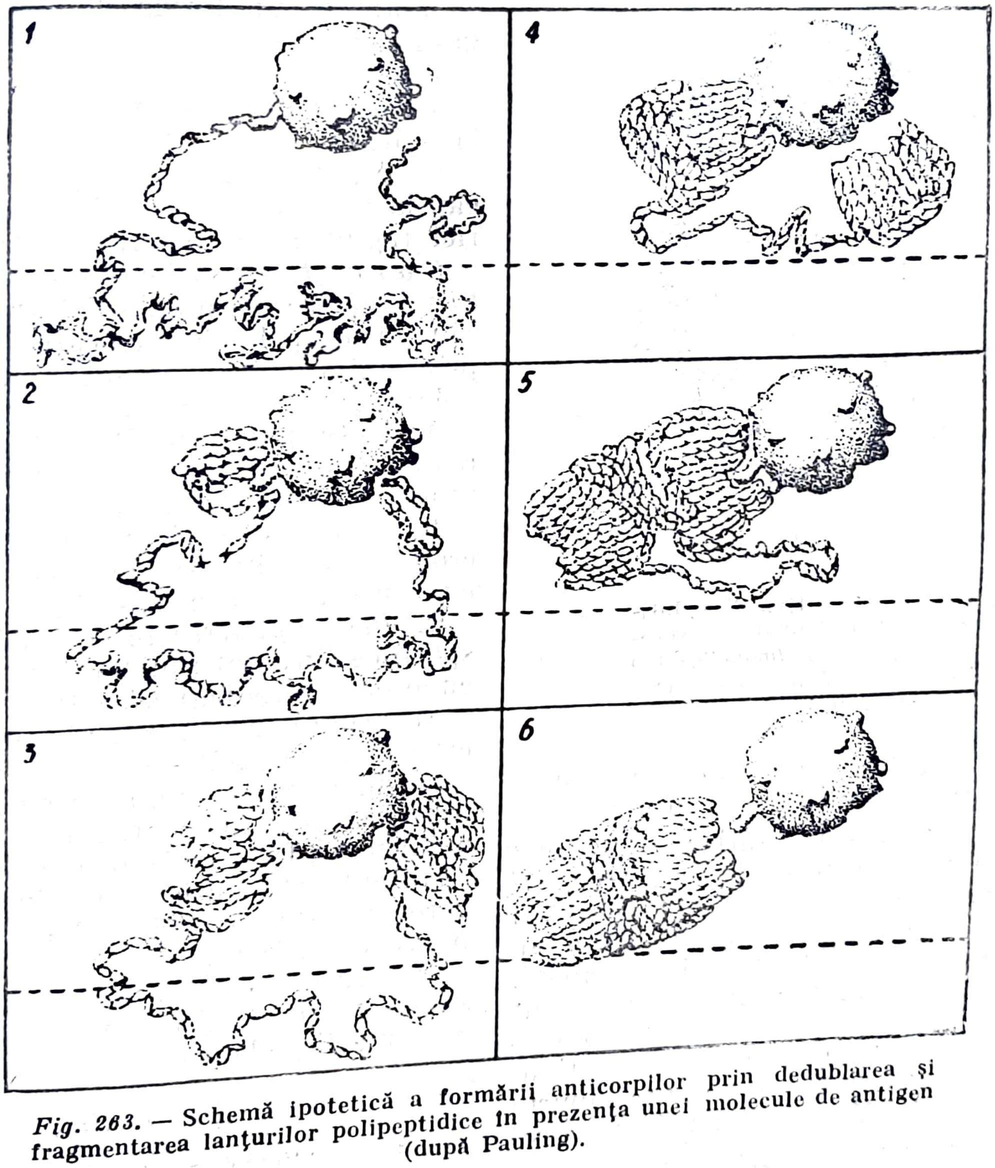


Fig. 263. — Schemă ipotetică a formării anticorpilor prin dedublarea şi fragmentarea lanţurilor polipeptidice în prezenţa unei molecule de antigen (după Pauling).

2. Electroliţii din mediu scad şi mai mult încărcătura electronegativă a particulelor de antigen, pînă cînd acesta, scăzînd sub un potenţial critic, repulsia devine mai mică decît coeziunea şi din acest moment, complexele antigen-anticorp încep să se alipească. Reacţia şi mai ales rapiditatea ei depind de pH ; există un pH optim. La pH prea acid sau prea alcalin se produce, fie aglutinarea spontană, fie o inhibiţie. Rapiditatea reacţiei depinde şi de temperatură. Temperatura scăzută diminuează viteza reacţiei, iar cea ridicată (peste 56°) face ca reacţia să nu mai fie specifică, din cauza denaturării proteinei anticorpului. Optimul de temperatură este între 37 şi 52°, după natura antigenului. Studierea antigenelor microbiene utilizate în reacţia de aglutinare a arătat că acestea sînt de mai multe categorii :

— *a)* Un *antigen H* la bacteriile mobile, flagelar, legat de cili, termolabil, rezistent la acţiunea formolului şi alterat de alcool. O suspensie de germeni ciliaţi (eventual omorîţi prin formol) sau o suspensie de cili, injectată la animale, provoacă apariția de aglutinine anti-*H*.

— *b*) Un *antigen O* somatic, legat de corpul microbian, termostabil, alterabil prin formol, dar rezistent la alcool. Dacă se injectează animalelor o suspensie de bacterii tratată cu alcool se provoacă apariția aglutininelor anti-*O*.

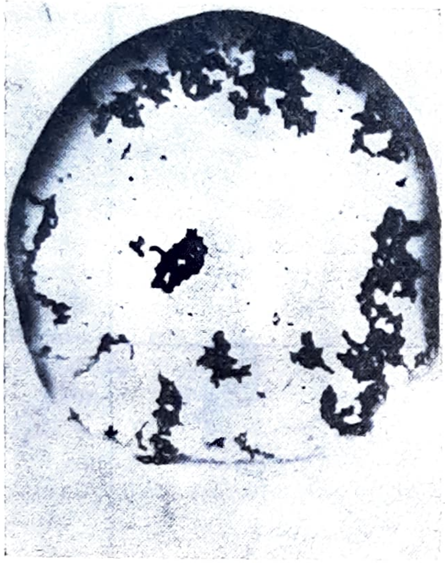


Fig. 264. — Reacție pozitivă de aglutinare pe lamă pentru identificarea serologică a unei tulpini de *Salmonella* după schema Kauffmann-White (colecția autorului).

— *c*) În afară de aceste antigene s-a mai descris, la genul *Salmonella* și la *Esch. coli* un alt antigen, sub denumirea *antigen Vi*, care este situat la suprafața corpului microbian analog cu antigenul *O*, dar situat mai superficial. Este un antigen termolabil, de înveliș, rezistent la alcool și formol și alterat de fenol. În funcție de structura acestor diferite antigene, aglutinarea microbilor poate fi de mai multe tipuri:

Aglutinarea de tip H se produce între serul specific anti- *H* și o bacterie ciliată.

Caracteristicile aglutinării de tip H sînt următoarele:

1. se formează repede (2 ore);

2. se depune ușor;

3. apare sub formă de flocoane mari, semănînd cu fulgii de zăpadă;

4. sedimentul este bogat, voluminos;

5. sedimentul este ușor dislocat și se distruge ușor prin agitare.

Aglutinarea *H* se produce prin imobilizarea bacteriilor, imobilizarea fiind datorită încîlcirii cililor.

Caracteristicile aglutinării de tip O.

1. se formează încet (24 de ore);

2. se depune încet;

3. apare sub formă de grunji mici (aspect granular);

4. sedimentul este redus;

5. sedimentul este greu dislocat, dar rezistent la agitare;

6. Aglutinarea se produce prin alăturarea cap la cap, sau perpendiculară a polilor bacteriei (aglutinarea polară, în special la bacili).

Caracteristicile aglutinării de tip Vi: se prezintă sub formă de grunji fini sau uneori pelicule fine, care se detașează greu prin agitare; și această aglutinare poate fi polară.

Aplicații practice. Datorită specificității ei, reacția de aglutinare se utilizează mult în practică și anume în două scopuri:

1. *Pentru identificarea serologică* a unui microb izolat dintr-o infecție a organismului, cu ajutorul unui ser aglutinant cunoscut.

2. *Pentru punerea în evidență* a aglutininelor specifice din serul unui bolnav, față de un microb cunoscut (serodiagnosticul).

În primul caz elementul necunoscut este microbul (antigenul) care a cauzat infecția și a cărui identitate o stabilim cu ajutorul unui ser preparat special pentru aceste scopuri, serul aglutinant. În cazul al doilea, elementul necunoscut este anticorpul din serul bolnavului care se testează față de bacteria bănuită a fi provocat infecția.

Pentru aceste două feluri de cercetări ne folosim de metoda aglutinării în tuburi și metoda aglutinării pe lamă.

A. SERODIAGNOSTICUL

(cercetarea anticorpilor aglutinanți în serul unui bolnav)

1. **Serodiagnosticul în tuburi.** Se bazează pe cercetarea proprietăților aglutinante ale serului de cercetat, utilizat în diluții progresive față de un microb cunoscut.

Elementele necesare: a) serul de cercetat (anticorp necunoscut);

b) antigenul (cunoscut);

c) soluție clorurosodică 8,5‰.

d) tuburi de aglutinare (12/120 mm), pipete gradate, stelaj.

Serul de cercetat. Recoltarea sîngelui se face în timpul evoluției bolii la aproximativ 7–10 zile de la debut, acesta fiind momentul apariției aglutininelor specifice în circulația generală. Se recoltează 5–10 ml sînge într-o eprubetă sterilă și se lasă să se retracte cheagul. Serul se decantează cu pipeta și trebuie să fie limpede și lipsit de hematii.

Serul se păstrează la gheţar.

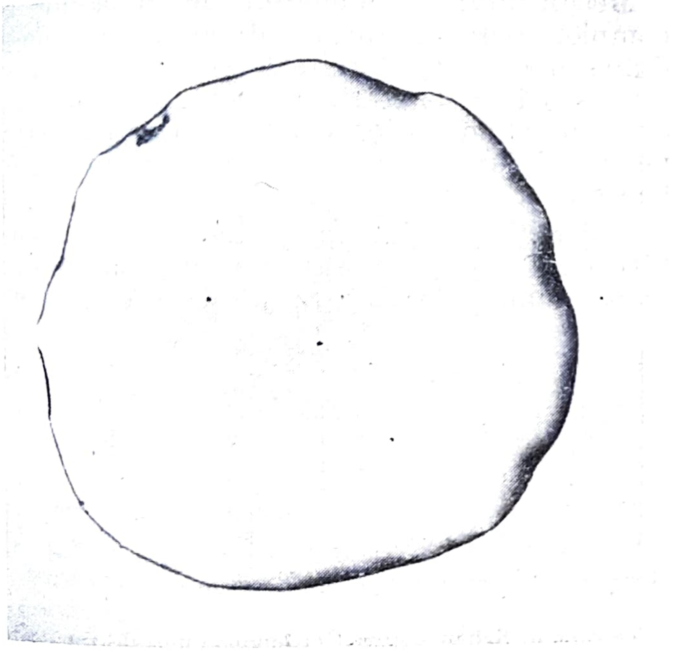


Fig. 265. — Reacţie negativă de aglutinare pe lamă pentru identificarea unei tulpini de *Salmonella* după schema Kauffmann-White. Reacţie martor pentru controlul formei „S" a tulpinii (colecţia autorului).

Antigenul este reprezentat de suspensia microbiană faţă de care cercetăm aglutininele. Poate fi constituit dintr-o suspensie de germeni vii întreţinuţi în laborator sau din suspensii de germeni omorîţi cu fenol, alcool sau formol. Suspensia proaspătă se prepară dintr-o cultură de 24 de ore pe geloză înclinată. Cultura de germeni trebuie să fie neapărat de tip S, căci germenii proveniţi din culturile R aglutinează spontan în soluţie clorurosodică $8,5^{0}/_{00}$ (fără intervenţia unui anticorp specific). De aceea, orice reacţie de aglutinare va fi însoţită de un martor, pentru a dovedi specificitatea aglutinării. Suspensiile de antigen trebuie să aibă o anumită opacitate, care corespunde aproximativ cu încărcătura unei anse de 2 mm diametru, suspendată în 4 ml soluţie clorurosodică $8,5^{0}/_{00}$.

TABELUL 96

Schema reacţiei de aglutinare în tuburi (serodiagnostic)

Tubul	I	II	III	IV	V	M
Soluţie clorurosodică $8,5^{0}/_{00}$	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser de cercetat diluat 1/10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Antigen	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Diluţia finală a anticorpilor	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	—

Tehnica reacţiei. Se aşază în stelaj o serie de tuburi. Se notează pe primul tub numărul serului şi numele tulpinii faţă de care se testează serul. Se notează M tubul martor. Se pipetează în toate tuburile, afară de primul, cîte 0,5 ml soluţie clorurosodică $8,5^{0}/_{00}$. Se diluează serul de cercetat 1/10 (1 ml ser + 9 ml soluţie clorurosodică $8,5^{0}/_{00}$. Din diluţia 1/10 se pun 0,5 ml ser în tuburile nr. 1 şi nr. 2. Din tubul nr. 2 se ia 0,5 ml şi se trec în tubul nr. 3, de aici 0,5 ml din tubul nr. 4 şi aşa mai departe, iar în tubul ultim se aruncă 0,5 ml.

În tubul M nu se introduce ser de cercetat, ci numai soluţie clorurosodică $8,5^{0}/_{00}$. Se adaugă apoi în toate tuburile cîte 0,5 ml antigen (volumul final în toate tuburile este de 1 ml). Cînd facem analiza serică calitativă, lucrăm cu antigene H, O şi Vi, separat, cu cîte o serie de diluţii. După repartizarea serului şi a antigenului, se agită tuburile şi se aşază, fie la 37°, fie la baia de apă la 52°, timp de 2 ore, după care se face citirea şi se lasă apoi pînă a doua zi la temperatura camerei cînd se face citirea definitivă.

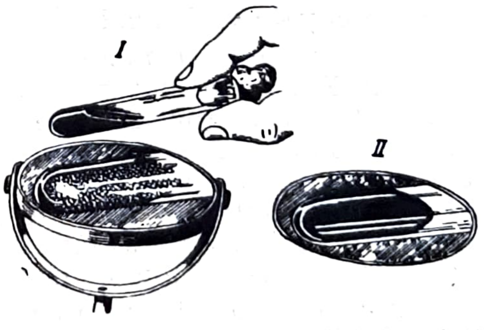


Fig. 266. — Citirea unei reacţii de aglutinare în tuburi cu ajutorul oglinzii microscopului: *I*-pozitiv; *II*-negativ.

Citire şi interpretare. Citirea rezultatelor se face cu ochiul liber, cu lupa sau cu aglutinoscopul. În tuburile cu reacție pozitivă se observă un depozit, iar lichidul de deasupra este clar. În tuburile unde nu s-a produs aglutinarea și în tubul ,,martor'' suspensia rămîne opalescentă și fără depozit. Spre a examina caracterul aglutinării, se agită ușor tubul. Intensitatea aglutinării se notează cu semnul plus (+), numărul de plusuri indicînd gradul de intensitate a reacției. Diluția maximă a serului în care se mai observă fenomenul de aglutinare se numește titrul serului.

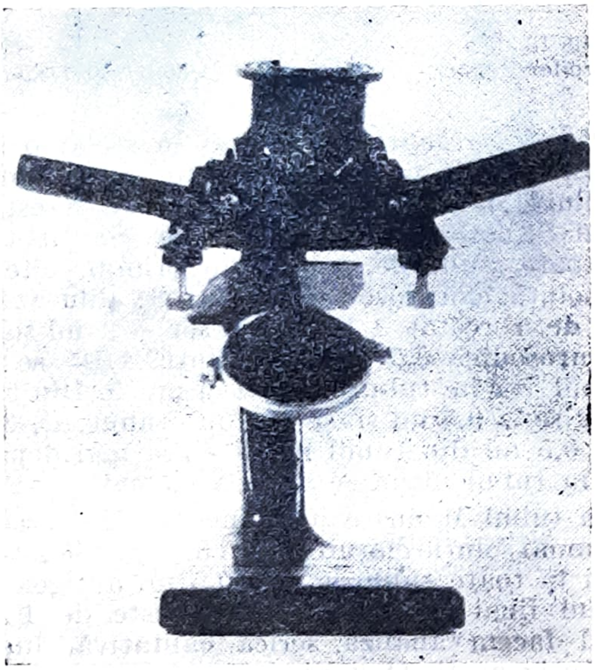


Fig. 267. — Aglutinoscop.

Rezultatul se exprimă în modul următor: serul bolnavului X a aglutinat antigenul tific în diluția 1/160. Titrurile aglutinate ale serurilor variază. În general, un serodiagnostic este pozitiv dacă titrul aglutinant al serului este superior titrului de aglutinare care se găsește în mod obișnuit la indivizii sănătoși dintr-o colectivitate sau dintr-o regiune dată.

Fenomenul de zonă. În cursul aplicării practice a reacțiilor de aglutinare sub formă de serodiagnostic asistăm uneori la o comportare neobișnuită a acestei reacții antigen-anticorp. Se constată că aglutinarea nu apare în toate tuburile reacției și asistăm la o alternare a glutinării, cu lipsa de aglutinare în anumite zone ale seroreacției. Această comportare a reacției de aglutinare a fost denumită fenomenul de zonă. Se întîlnește la unele bacterii, dar mai ales la brucele, unde reprezintă o dificultate la realizarea serodiagnosticului. Uneori aglutinarea nu apare în zona concentrațiilor mari de ser imun, de pildă în diluții de 1/20, 1/30 și este puternică în zona concentrațiilor mici, ca de exemplu în diluția 1/100, 1/200 etc. Lipsa aglutinării în zona tuburilor cu concentrații mari de ser imun a fost denumită fenomen de *prezonă*. Alteori lipsa de aglutinare apare în zona concentrațiilor scăzute de ser imun, adică în tuburile diluțiilor mari de ser. Această comportare a fost denumită fenomen de *postzonă*.

Mecanismul fenomenului de zonă nu este complet elucidat încă; după cercetările lui Jones și Dreutt, el ar fi determinat de adsorbția de către bacterii a unei globuline serice, care, învelind ca o peliculă bacteriile, stînjenește acțiunea forțelor de coeziune dintre bacterii.

2. **Serodiagnosticul pe lamă.** În cazul necesității de a depista o stare de îmbolnăvire la un mare număr de indivizi dintr-o colectivitate se folosește ca metodă de orientare serodiagnosticul pe lamă, fiind ușor de executat chiar în absența unui laborator utilat.

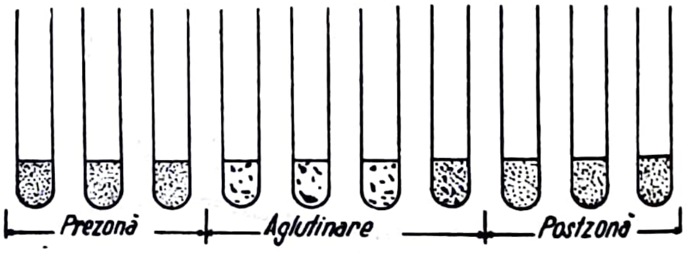


Fig. 268. — Schema apariției fenomenului de zonă într-o reacție de aglutinare (adaptare după Boyd).

Materiale necesare: lame curate, ac steril, soluție clorurosodică $8,5^{0}/_{00}$, o pipetă Pasteur și antigen.

Tehnica. Se înțeapă pulpa degetului, se pun pe lamă 2 picături, se lasă să se usuce la adăpost de muște. Apoi se aplică antigenul, cîte o picătură pentru fiecare picătură de sînge. Se amestecă cu o pipetă Pasteur, fără a zgîria sau ridica sîngele uscat din picătură. Dacă picătura de sînge aglutinează cu antigenul respectiv, apar în 1—3 minute grunji, care indică o reacție pozitivă.

Această reacție de orientare trebuie completată totdeauna la cazurile pozitive prin metoda serodiagnosticului în tuburi. O asemenea metodă se folosește sub denumirea „reacția Kudicke-Steuer” în serodiagnosticul de orientare al tifosului exantematic.

B. IDENTIFICAREA SEROLOGICĂ A UNUI MICROB PRIN REACŢIA DE AGLUTINARE

1. **Metoda aglutinării pe lamă.** Elementele necesare :

a) seruri aglutinante cunoscute ;

b) cultura de 24 de ore a microbului de identificat ;

c) soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$, lame sau tuburi, pipete, stelaj.

Serurile aglutinante. Se obțin prin inoculări repetate, ale iepurilor, cu microbi sau antigene microbiene, pentru care vrem să preparăm serul aglutinant. Sîngerarea iepurelui se face prin puncția carotidei. Serul aglutinant poate fi polivalent, adică să cuprindă toate aglutininele existente pentru un anumit microb sau monovalent, atunci cînd conține numai o singură categorie de aglutinine.

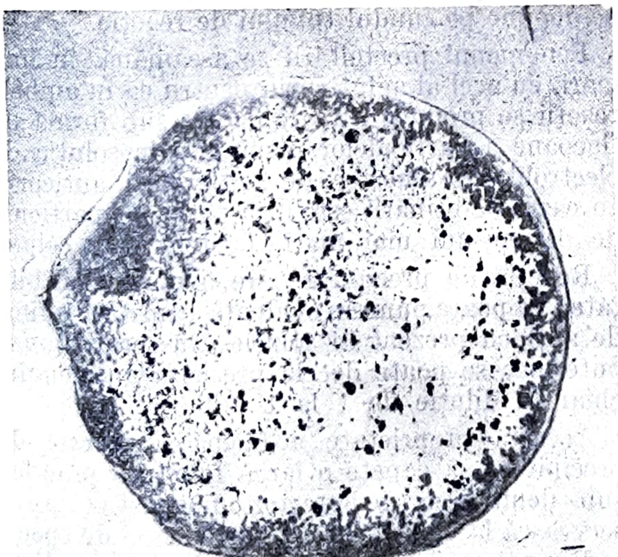


Fig. 269. — Seroreacția de aglutinare pe lamă Huddleson-Kaimațova. Reacție pozitivă (colecția autorului).

Tehnica. Pe o lamă bine degresată se pune la un capăt o picătură de ser aglutinant diluat 1/10, iar la celălalt, o picătură de soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$. Se suspendă o porțiune dintr-o colonie izolată pe geloză a microbului de identificat, atît în picătura de soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$, cît și în picătura de ser aglutinant. Lama se înclină de mai multe ori și după 1—2 minute se observă fenomenul de aglutinare, în cazul în care microbul corespunde serului aglutinant. Picătura de soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$ cu suspensie microbiană servește drept control pentru bacteriile care aglutinează spontan în soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$. Coloniile bacteriene în formă de R nu pot fi folosite în cazul reacțiilor serologice de aglutinare.

Interpretare : bacteria de identificat a fost aglutinată de serul specific antitific. Este vorba deci, de un bacil tific.

2. **Metoda aglutinării în tuburi.** Această aglutinare se practică după schema reacției de aglutinare, în tuburi pentru serodiagnostic. Într-o serie de tuburi de aglutinare se fac diluții crescînde din serul aglutinant cunoscut. Se adaugă în fiecare tub o cantitate de suspensie din cultura microbului de identificat. Se agită tuburile, se țin 2 ore la 37° și apoi la temperatura camerei 20—24 de ore.

Interpretare. Serul care aglutinează în diluția cea mai mare arată identitatea microbului izolat.

Se întîmplă uneori ca microbul izolat, care trebuie identificat, să fie aglutinat de mai multe seruri la un titru apropiat și să nu putem identifica microbul. Pentru a preciza diagnosticul în acest caz, vom reface reacția, mărind numărul diluțiilor de ser pînă la titrul serului aglutinant.

Aglutinarea pasivă sau indirectă este o reacție antigen-anticorp, în care anticorpul aglutinează antigenul adsorbit pe diverse substraturi. Au fost propuse diferite adsorbante ; bacteriile pentru adsorbția particulelor virale, particule de colodiu, particule de coloranți insolubili etc. În ultimul timp se întrebuințează mult ca adsorbanți hematiile de la diferite specii animale. Cele mai adecvate unui asemenea scop par să fie hematiile de găină. Principiul reacției constă în adsorbția pe hematii a antigenelor sau haptenelor într-un prim timp și în aglutinarea hematiilor port-antigen de către serurile imune, în al doilea timp al reacției.

S-a constatat că simplul contact cu hematii proaspete este suficient pentru fixare în cazul antigenelor polizaharidice, ca de pildă pentru *H. influenzae*, bacilul Koch, *P. pestis*, *P. tularensis*, *Esch. coli* și *Proteus vulgaris*. Alte antigene însă, în special antigenele proteice, necesită în prealabil o tratare a hematiilor cu tanin, pentru ca adsorbția antigenului pe suprafața hematiei să fie realizată în bune condiții. În practica diagnosticului de laborator, această reacție a fost aplicată la diagnosticul unor infecții bacteriene și virale. De pildă, în diagnosticul serologic al tuberculozei umane, Midelebrook și Dubos au preconizat reacția de hemaglutinare cu polizaharid extras din bacilul tuberculos uman și adsorbit pe hematii de găină. În ultimii ani s-a izolat o substanță antigenică comună agenților etiologici ai tifosului exantematic epidemic și murin, care poate fi adsorbită pe hematii și determină hemaglutinarea lor în contact cu serul imun. Anticorpii care determină această hemaglutinare par să fie diferiți de anticorpii care aglutinează cu antigenele rickettsiene și ale proteului OX_{19}. O altă constatare importantă a fost faptul că hemaglutinarea poate fi inhibată de unele seruri, extracte de organe sau de albumina de ou. Această proprietate a fost folosită în practică la diagnosticul gripei sub denumirea de hemaglutinoinhibare și pentru determinarea cantitativă a antigenului în lichidul cefalorahidian la bolnavii cu meningită determinată de *H. influenzae*.

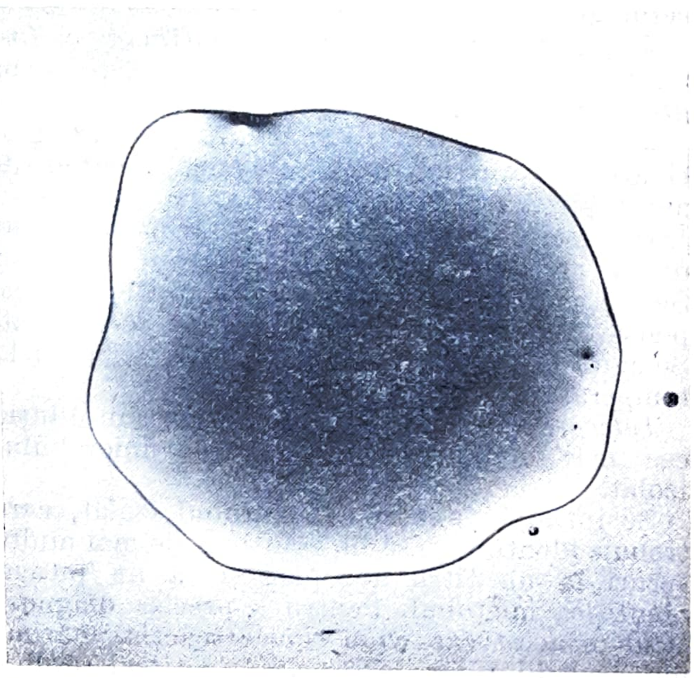


Fig. 270. — Seroreacție de aglutinare pe lamă Kudicke-Steuer. Reacție negativă (colecția autorului).

Reacția de aglutinare pasivă sau indirectă, mai ales sub forma de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare, este folosită din ce în ce mai mult în diagnosticul virozelor și a început să fie utilizată ca metodă de diagnostic în unele infecții bacteriene, ca tuberculoza, pesta, tularemia, bruceloza etc.

REACȚIA DE PRECIPITARE

Precipitarea este o formă de manifestare a reacției antigen-anticorp, care se produce atunci cînd antigenul se găsește sub formă de particule extrem de mici, dizolvate în amestecul inițial, de antigen și anticorp.

Precipitarea este rezultatul acțiunii, în prezența electroliților, a anticorpilor specifici dintr-un ser imun asupra substanței precipitabile, antigenul.

Reacția a fost descoperită de Kraus, în 1897, cînd, lucrînd cu filtratul limpede al unei culturi de *Pasteurella pestis* și amestecîndu-l cu ser imun antipestos, a constatat că amestecul inițial clar se tulbură după un timp și se formează un precipitat sub formă de flocoane, care se depune pe fundul tubului de reacție.

Fenomenul precipitării se aseamănă, în linii mari, cu acel al aglutinării, pentru că în ambele reacții se produce o îngrămădire sub formă de flocoane a particulelor răspîndite în soluția de electrolit cu amestec de antigen și anticorp. În cazul aglutinării este însă vorba de particule de dimensiuni mai mari, bacterii sau celule.

Reacția de precipitare are o mare sensibilitate; ea poate pune în evidență cantități infime de antigen prezent în soluție. Cu seruri imune puternice se poate decela prezența antigenului chiar în diluție de 1 la 1 milion.

Această proprietate a făcut ca reacția de precipitare să capete o largă folosință practică sub denumirea de precipitodiagnostic și să servească la identificarea apartenenței de specie a diverselor proteine animale, la diagnosticul diferitelor adaosuri proteice în controlul calității produselor alimentare și la identificarea unor antigene bacteriene, ca *B. anthracis*, bacilul morvei, pneumococul, streptococul, meningococul etc. Dintre tehnicile de evidențiere a reacției de precipitare, în practică se folosesc mai ales următoarele :

Tehnica precipitării în inel, în care soluțiile de antigen și anticorpul sînt puse în contact în așa fel, încît să nu se amestece, iar reacția apare sub forma unui inel de precipitare, de culoare albicioasă, la interlinia de contact a celor două soluții de densități diferite.

Tehnica precipitării în amestec sau flocularea, realizată în 1923 de Ramon ; într-o serie de eprubete se face un amestec între serul imun și antigen în anumite proporții; reacția apare în întreaga masă a amestecului, la început sub formă de ușoară opalescență, care se accentuează, iar complexul antigen-anticorp format precipită sub forma de flocoane mari ca fulgii de zăpadă, care apoi sedimentează pe fundul tubului de reacție. Reacția începe cel mai devreme în eprubeta în care cantitatea de ser a neutralizat cantitatea totală de antigen. Această comportare a fost denumită „floculare inițială'' și permite titrarea prin floculare a antigenelor și antiserurilor imune.

Tehnica precipitării în gel. În 1946, Oudin a arătat posibilitatea efectuării reacției de precipitare în agar sau gelatină care, prin faptul că permite o difuziune lentă a soluțiilor de antigen și anticorp, îngăduie realizarea proporțiilor optime de amestec în condiții mai favorabile și obținerea unor linii de precipitare foarte net delimitate. Datorită acestei proprietăți de difuziune lentă a soluțiilor de antigen și de anticorp în gel, s-a putut ajunge la diferențierea amestecurilor complexe de antigene, deoarece fiecare sistem antigen-anticorp formează o linie de precipitare bine precizată. Metoda este larg folosită azi în cercetările științifice de imunologie și imunochimie și a intrat în practica diagnosticului de laborator pentru evidențierea toxinogenezei *in vitro* a bacilului difteric, sub denumirea de reacția E. O. F. (Elek-Ouchterlony-Frobisher).

Elementele reacției sînt următoarele :

Antigenele folosite în reacția de precipitare sînt soluții coloidale ; ele sînt deci în stare de dispersie macromoleculară într-un mediu lichid, soluția de electrolit. Soluția de antigen poate conține molecule antigenice diverse, alcătuind un complex antigenic. Astfel de antigene pot fi antigenele naturale folosite în reacțiile de precipitare, ca : serul sanguin, care este un amestec complex de globuline și albumine ; extractele microbiene, ca antigenul Ascoli, care este un amestec complex de proteine, polipeptide, polizaharide și acizi nucleici ai bacilului antraxului ; filtratele de cultură microbiană, ca exotoxinele, care reprezintă un amestec complex de toxină cu proteine bacteriene, peptonă și polipeptide din mediul de cultură. Datorită faptului că antigenul se păstrează sub formă moleculară, este posibilă folosirea unor soluții purificate de antigene, deci substanțe de natură chimică bine cunoscută, care asigură o mai mare specificitate reacției. Așa de pildă, se fac reacții de imunoprecipitare cu proteine purificate, γ-globulină, serum-albumină sau ovalbumină cristalizată sau polizaharide bacteriene purificate, polizaharidul pneumococic sau streptococic.

Anticorpii precipitanți sau precipitinele apar în serurile animalelor imunizate cu antigenul corespunzător. Dacă imunizarea s-a făcut cu extracte sau corpi microbieni, vorbim de bacterio-precipitine; în cazul că antigenul folosit la imunizare a fost de natură proteică (extracte de organe, lapte, proteine diverse) folosim termenul de proteino-precipitine.

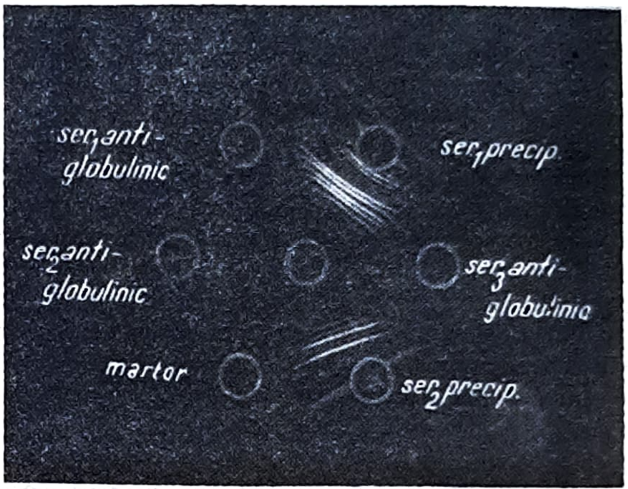


Fig. 271. — Reacție de precipitare în gel pentru identificarea unui antigen proteină umană (după Mesrobeanu-Mitrică).

Serurile imune folosite în reacțiile de precipitare au fost denumite seruri precipitante sau antiseruri.

Mecanismul reacției este asemănător cu cel al aglutinării, cu deosebirea că antigenul nu se găsește în particule vizibile microscopic, ci sub formă de macromolecule.

Într-o primă fază, strict specifică, se combină moleculele de antigen cu anticorp, formînd complexele inițiale. În faza a doua complexele inițiale se reunesc în complexe secundare, din ce în ce mai mari, sub acțiunea ionilor anorganici din soluția de electrolit, determinînd apariția unui precipitat vizibil, care iese din soluție. Macroscopic, desfășurarea reacției are loc astfel : în lichidul cu amestecul de antigen și anticorp, inițial limpede, apare o tulbureală ușoară care, pe măsură ce reacția progresează, se intensifică și apare un precipitat, întîi răspîndit sub formă de flocoane în toată masa amestecului și care apoi se depune pe fundul tubului.

Compoziția precipitatului. Precipitatul specific este alcătuit din antigen și din anticorp, dar de cele mai multe ori anticorpul predomină, aproximativ în proporție de 1/10, sau chiar mai mult. Prin acest caracter precipitarea se deosebește de aglutinare, deoarece la aceasta din urmă cea mai mare parte a aglutinatului este reprezentată de antigen.

În aceste condiții, titrarea serurilor precipitante prin diluții succesive de anticorp, ca la aglutinare, ar fi foarte greu de realizat, deoarece reducerea cantității de anticorp ar micșora repede cantitatea de precipitat și astfel, combinarea între antigen și anticorp, chiar dacă se produce, nu mai este vizibilă. Cum însă precipitatul este format în cea mai mare parte din anticorp, el apare chiar și în prezența unor cantități foarte mici de antigen, ceea ce conferă o mare sensibilitate reacției de precipitare.

Proporția optimă. În reacțiile de precipitare, proporția în care se amestecă antigenul și anticorpul influențează mersul reacției, atît sub aspectul apariției precipitatului, cît și în ceea ce privește cantitatea de antigen și anticorp care se combină efectiv. Pentru un sistem antigen-anticorp dat există totdeauna o proporție determinată între cantitățile de antigen și de anticorp puse în contact pentru ca precipitatul să apară cît mai repede. Această proporție se numește proporția optimă. În amestecurile care se îndepărtează de proporția optimă apariția precipitatului este întîrziată. Proporția optimă este un raport constant, indiferent de concentrația absolută a antigenului și anticorpului. De exemplu, dacă 1 ml de antiser diluat 1/10 dă precipitarea cea mai rapidă cu 1 ml de antigen diluat 1/30, atunci 1 ml de antiser diluat 1/50 va da precipitarea cea mai rapidă, sau floculareа inițială cu 1 ml de antigen diluat 1/150; deci precipitatul se formează cel mai repede atunci cînd antigenul și anticorpul sînt puși în contact într-un raport cantitativ constant, totdeauna același pentru un sistem dat, care reprezintă proporția optimă. Dintr-o serie de tuburi de reacție, cu amestecuri în variate proporții de soluție de antigen și anticorp, floculareа inițială sau floculareа limită va apărea într-un singur tub, cel în care s-a realizat amestecul în proporție optimă. În acest tub spunem că s-a obținut o combinare integrală între antigen și anticorp, cu alte cuvinte, o cantitate de antigen s-a unit cu o cantitate echivalentă de anticorp și în acest amestec nu a mai rămas nici anticorp și nici antigen liber, necombinat. În celelalte tuburi ale reacției floculareа va apărea mai tîrziu; aceste tuburi reprezintă, la stînga și la dreapta tubului cu floculare inițială, zona în care există în amestec, fie exces de antigen, fie exces de anticorp.

Determinarea proporției optime prin stabilirea floculării inițiale este folosită în practică la titrarea exotoxinelor microbiene și a antiserurilor corespunzătoare, fie amestecînd cantități variabile de antiser cu cantități constante de antigen, ca în metoda Ramon cu antigen constant, fie amestecînd cantități variabile de antigen cu o cantitate constantă de antiser, ca în metoda Dean și Webb cu anticorp constant.

Factori secundari care influențează desfășurarea reacțiilor de precipitare. Apariția precipitatului vizibil și mai ales rapiditatea formării lui depinde, pe lîngă prezența în amestec a celor 2 factori specifici (antigenul și anticorpul în proporție optimă), de o serie de factori secundari sau nespecifici.

a) *Concentrația*. În general precipitatul apare cu atît mai repede, cu cît se utilizează soluții de antigen și anticorp mai concentrate.

b) *Electroliții*. În absența electroliților, adică a ionilor anorganici, precipitatul vizibil nu apare, pentru că formarea complexelor secundare, vizibile, este condiționată de prezența electroliților în amestec. Există în acest sens o concentrație optimă de electroliți.

c) *pH*. Există un pH optim în jurul neutralității. Dacă reacția amestecului este prea acidă sau prea alcalină, ea inhibează sau împiedică total apariția precipitatului.

d) *Lipoizii*. În multe cazuri s-a constatat că antigenele și mai ales antiserurile complet delipidate nu mai dau un precipitat vizibil, deși combinarea specifică dintre antigen și anticorp s-a realizat. Aceasta denotă că lipidele au un rol în procesele fizico-chimice de constituire a complexelor secundare, care determină apariția precipitatului.

e) *Temperatura*. În general precipitatul poate să apară în limite destul de largi de temperatură, de la 20 — 22° pînă la 52°, cu un optimum de temperatură în jurul a 37°. La temperaturi mai joase reacția este încetinită, iar la temperaturi înalte poate fi complet împiedicată.

Aplicații practice. *Reacția Uhlenhuth* reprezintă o reacție tipică de precipitare în inel, prin care se poate preciza cu siguranță dacă o pată de sînge, proaspătă sau uscată, găsită pe haine sau lenjerie, este de origine umană sau animală. Reacția se folosește în medicina judiciară.

Principiu. Un extract din pata de sînge de identificat constituie antigenul, care se pune în contact cu ser imun precipitant antiproteină umană. Apariția precipitatului arată că este vorba de prezența, în extractul de pată, a proteinelor serice umane și deci pata de sînge este de proveniență umană.

Materiale necesare. Serul precipitant antiproteină serică umană se obține prin injectarea repetată, la un lot de cîțiva iepuri, a unui amestec de seruri umane. Obișnuit se injectează intravenos o cantitate de 3 — 4 ml dintr-un amestec de 4 — 5 seruri umane. Injecțiile se repetă de 3 ori, la interval de 5 — 6 zile, cu aceeași doză de ser. La o săptămînă după ultima injecție, se face o sîngerare de probă din urechea iepurilor, pentru controlul titrului antiserului, apoi, la aproximativ 10 — 14 zile de la ultima injecție, se sîngerează complet animalele, se lasă să coaguleze sîngele, se decantează serul și se titrează. Se vor alege numai antiserurile cu titruri ridicate, adică acelea care precipită cu serul uman într-o diluție de cel puțin 1/10 000. Antiserurile alese se fiolează, se etichetează și se păstrează la ghețar. Întrucît prin învechire titrul precipitant al antiserurilor scade, trebuie controlate periodic.

Extractul de pată care reprezintă antigenul se obține prin diluarea petei de sînge incriminate în cîțiva ml soluție clorurosodică $8{,}5\,^0/_{00}$. Se filtrează prin hîrtie de filtru, iar lichidul limpede obținut constituie antigenul.

Reacția se execută folosind 5 tuburi cu lumenul îngust, special concepute pentru precipitarea inelară, în care se distribuie antigen ca atare și diluție de antigen 1/1 000 și 1/5 000 și ser precipitant antiproteină umană. Ca martori ai reacției se folosesc: ser normal de om diluat 1/1 000, care reprezintă martorul omolog pozitiv și ser normal de cal diluat 1/1 000 ca martor heterolog negativ.

Pentru ca reacția să se desfășoare în bune condiții, trebuie să luăm precauția ca antiserul precipitant să-l adăugăm ținînd pipeta cu vîrful lipit de peretele tubului, astfel ca antiserul a cărui greutate specifică este mai mare să se adune încet la fundul tubului și să nu se amestece cu antigenul. Tuburile nu se agită. Rezultatele se citesc după 5 — 10 minute la temperatura camerei, intercalînd între tuburi și sursa luminoasă, un fond negru, care ne ușurează citirea. Reacția este apreciată ca pozitivă dacă la suprafața de contact dintre cele două lichide din tuburile nr. 1, 2, 3 apare un inel opalescent. Extractul de antigen din pata de sînge cercetată conține proteine serice de origine umană. În tubul nr. 5 (martorul omolog) reacția trebuie să fie obligatoriu pozitivă și servește la controlul calității antiserului precipitant. În tuburile nr. 4 și 6, martori heterolog și nespecific, reacția trebuie să fie negativă și reprezintă controlul bunei desfășurări a reacției.

TABELUL 97

Schema reacției Uhlenhuth

Tub	1	2	3	4	5
	ml				
Antigen nediluat	0,7	—	—	—	—
Antigen diluat 1/1 000	—	0,7	—	—	—
Antigen diluat 1/5 000	—	—	0,7	—	—
Ser normal de cal dil. 1/1 000	—	—	—	0,7	—
Ser normal de om dil. 1/1 000	—	—	—	—	0,7
Ser precipitant antiproteină umană	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Reacția de floculare Ramon reprezintă cea mai importantă aplicație practică a determinării proporției optime care este folosită la titrarea *in vitro* a exotoxinelor microbiene și a antiserurilor corespunzătoare.

Această titrare ne permite să stabilim valoarea antigenică a unei toxine sau anatoxine, cum sînt, de pildă, toxina și anatoxina difterică.

Principiu: cu ajutorul unui ser antidifteric cu titru cunoscut, din care facem diluții succesive, la care adăugăm cantități fixe de toxină difterică de titrat, putem stabili conținutul în unități floculante al toxinei sau „Lf", știind că o unitate antitoxică corespunde cu 1 Lf (*Limes floculans*).

Materiale necesare: ser antidifteric cu titrul cunoscut, ca de pildă 100 u. antitoxice/ml, soluție clorurosodică $8{,}5\,^0/_{00}$, toxina difterică de cercetat 6 tuburi de floculare, pipete gradate de precizie și baie de apă reglată la 52°.

Desfășurarea reacției. Într-o serie de 6 tuburi se introduc cantități crescînde de ser antidifteric, care se completează cu ser fiziologic, pentru a aduce fiecare tub la volumul de 1 ml.

Se adaugă apoi cîte 1 ml din toxina de cercetat în fiecare tub, se amestecă prin agitare şi se aşază într-un stelaj metalic la baia de apă.

TABELUL 98

Schema reacţiei

Tub	1	2	3	4	5	6
	ml					
Soluţie clorurosodică $8,5^{0}/_{00}$	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4
Ser antidifteric (100 u.a./ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Toxina difterică de cercetat	1	1	1	1	1	1

Citirea reacţiei. Dacă floculares iniţială apare în tubul nr. 5, care conţine volumul de 0,5 ml ser antidifteric, deci 50 u. antitoxice, rezultă că într-un ml din toxina de cercetat vor fi 50 Lf. Toxina difterică are un conţinut de 50 u. floculante/ml, ceea ce se exprimă astfel : Lf = 50.

În această reacţie mai intervine şi noţiunea de ,,Kf'' sau timp de floculare, care reprezintă timpul minim în care apare flocularea iniţială. Kf poate fi variabil, de la cîteva minute pînă la cîteva ore, pentru diferite toxine, fiind constant pentru aceeaşi toxină. O toxină difterică, pentru a fi folosită în bune condiţii la transformarea ei în anatoxină, trebuie să aibă minimum 30 de Lf/ml. În acelaşi fel se poate realiza titrarea unui ser antidifteric cu ajutorul unei toxine difterice cu titrul cunoscut.

IMUNOCITOLIZA

(Bacterioliza şi hemoliza)

Este o formă vizibilă a reacţiei dintre antigen şi anticorp, care se produce atunci cînd antigenul se prezintă sub forma unei celule lizabile, bacterie sau hematie şi care, spre deosebire de reacţiile de aglutinare şi precipitare, necesită prezenţa unui al treilea element, denumit *alexină* sau *complement.*

Mecanismul intim al acestei reacţii nu este pe deplin cunoscut. S-a constatat că alexina are proprietatea de a se fixa pe complexul antigen-anticorp, hematie ser-antihematie, sau bacterie-ser antibacterian, producînd o alterare a membranei celulare şi permiţînd difuzarea conţinutului celular în exterior, care se traduce prin hemoliză, în cazul hematiilor, şi prin transformare granulară urmată de liză, în cazul unei bacterii lizabile.

Deci, în fenomenul de imunocitoliză intervin următorii 3 factori :

1. *Antigenul* trebuie să fie în primul rînd o celulă lizabilă. Cele mai sensibile celule la liză sînt hematiile (hemoliză). Dintre bacterii, vibrionul holeric şi microbii înrudiţi cu el sînt cei mai uşor lizabili (vibrioliză). Alte bacterii, cum ar fi cele din genul *Salmonella*, sînt lizate mai greu, pe cînd stafilococii nu sînt lizaţi de loc.

2. *Serul imun*, anticorpul specific, folosit în reacţia de imunocitoliză, poate fi reprezentat printr-un ser imun recoltat de la bolnav sau convalescent sau prin ser obţinut după imunizarea animalelor de laborator. Serurile se utilizează încălzite 30 de minute la 56° în baie de apă, pentru a inactiva alexina, păstrîndu-se numai anticorpii specifici.

Bordet a denumit acest anticorp ,,sensibilizatrice'', datorită faptului că sensibilizează antigenul la acţiunea alexinei ; Ehrlich l-a denumit ,,amboceptor'', deoarece prezintă o dublă polaritate, necesară legării lui atît cu antigenul, cît şi cu alexina.

3. *Complementul sau alexina* este un factor nespecific, care se găseşte în serul normal proaspăt al animalelor şi omului şi care se fixează numai pe complexul antigen-anticorp specific, producînd o modificare vizibilă, liza sau bacterioliza, în cazul cînd antigenul este o celulă lizabilă. Trebuie reţinut faptul că alexina nu se fixează nici pe antigen şi nici pe anticorp separat, ci numai pe complexul antigen-anticorp.

În mod practic, în reacţiile de liză sau de fixare de complement, alexina este utilizată sub forma serului proaspăt de cobai.

Bacterioliza

În practica de laborator reacţia de bacterioliză este folosită ca o metodă de identificare a vibrionului holeric şi cunoscută sub denumirea de fenomenul Pfeiffer-Issaev, atunci cînd se produce *in vivo* la cobai, sau de fenomenul Bordet, atunci cînd se realizează *in vitro.*

Fenomenul Pfeiffer-Issaev a fost pus în evidenţă prin inocularea vibrionilor în cavitatea peritoneală a cobaiului.

Se folosesc 2 cobai, unul imunizat activ faţă de vibrionul holeric şi unul normal ca martor, cărora li se inoculează cîte 1 ml suspensie din cultura de vibrioni de cercetat. Din 10 în 10 minute se recoltează exsudatul peritoneal de la cei 2 cobai şi se fac frotiuri, care se fixează, se colorează şi se examinează la microscop.

Dacă pe frotiurile făcute cu exsudatul peritoneal al cobaiului imunizat se observă aglutinarea şi liza vibrionilor, în timp ce pe frotiurile făcute din exsudatul peritoneal al cobaiului martor morfologia vibrionilor nu se modifică, iar numărul lor creşte, înseamnă că vibrionul de identificat este un vibrion holeric.

La primul cobai vibrionii îşi pierd mobilitatea, îşi modifică forma, se transformă în formaţiuni ovale, apoi în granule sferice, (transformare granulară), îşi pierd proprietatea de a se colora şi uneori se observă dispariţia completă prin liză.

Întregul proces durează 20 de minute — 1 oră. Cobaiul martor moare, datorită multiplicării vibrionilor holerici în cavitatea peritoneală şi eliberării masive de endotoxină. Primul cobai se vindecă. Deoarece nu totdeauna putem avea cobai imunizaţi activ antiholeric, metoda clasică se înlocuieşte prin următoarea metodă: doi cobai normali sînt inoculaţi, primul cu 1 ml cultură pură din germenul de identificat + 2 ml ser antiholeric, iar al doilea cu 1 ml din aceeaşi cantitate + 0,2 ml ser normal (cobai martor). Urmărirea lor se face ca mai sus. Dacă pe frotiurile făcute cu exsudatul peritoneal al primului cobai, inoculat cu cultură + ser antiholeric, se observă liza, iar pe cele făcute cu exsudatul peritoneal de la al doilea cobai, martor inoculat cu cultură + ser normal, nu se observă liză, ci multiplicarea bacteriilor, înseamnă că microbul inoculat este vibrionul holeric.

Şi aici cobaiul martor va muri, datorită infecţiei cu vibrioni holerici, iar primul cobai imunizat pasiv cu ser antiholeric, va supravieţui.

Bordet a observat că într-o suspensie făcută dintr-o cultură tînără de vibrioni holerici, privită la microscop, vibrionii apar mobili şi dispersaţi omogen în lichid. Dacă la o astfel de suspensie se adaugă un ser imun antiholeric, proaspăt, se observă, chiar cu ochiul liber, apariţia unor flocoane în interiorul lichidului, iar la microscop se vede că aceste flocoane nu sînt altceva decît grămezi de vibrioni holerici aglutinaţi, care şi-au pierdut complet mobilitatea. După scurt timp flocoanele încep să dispară, iar la microscop se constată transformarea vibrionilor în mici granule slab colorabile, care ulterior sînt topite complet, iar lichidul se limpezeşte. Aceasta denotă că s-a produs vibrioliza. Acest fenomen se opreşte la stadiul de aglutinare dacă serul este în prealabil încălzit la 56° timp de o jumătate de oră.

În aceste condiţii liza vibrionilor nu se mai produce. Fenomenul poate fi însă completat, dacă la amestecul de suspensie microbiană cu ser specific încălzit se adaugă o cantitate de ser proaspăt, provenit de la orice animal normal. Serul imun proaspăt conţine, atît anticorpul specific, cît şi alexina, încît el poate produce singur vibrioliza.

Serul imun încălzit la 56° pierde alexina; de aceea, deşi anticorpul specific termostabil sensibilizează antigenul, el singur însă nu poate produce liza. Prin adăugare de ser proaspăt, provenit de la un animal sănătos, care conţine alexină, fenomenul este completat şi vibrioliza se produce.

Hemoliza

În practica diagnosticului de laborator se foloseşte mult un alt aspect al fenomenului de imunocitoliză, hemoliza.

După descoperirea fenomenului de bacterioliză, Bordet a constatat că la un animal care a fost imunizat cu o suspensie de hematii de origine heterologă, serul capătă proprietatea de a liza puternic *in vivo* sau *in vitro* hematiile provenite de la aceeaşi specie de animal cu care s-a făcut imunizarea.

Acest fenomen este asemănător fenomenului de bacterioliză. El se poate reproduce *in vivo*, utilizînd animale imunizate activ cu hematii. De asemenea, se poate reproduce *in vitro* în condiţiile arătate de Bordet.

În mod obişnuit, reacţia de hemoliză se realizează *in vitro* adăugînd, peste o suspensie de hematii, o cantitate de ser hemolitic specific proaspăt. După trecerea unui anumit timp, amestecul se limpezeşte şi se colorează în roşu clar, datorită trecerii în soluţie a hemoglobinei din hematii. De fapt, hemoliza nu este întru totul asemănătoare bacteriolizei, deoarece hematiile nu se lizează integral, ci îşi permeabilizează membrana, îngăduind desprinderea hemoglobinei de pe stromă şi trecerea ei în soluţie. Dacă centrifugăm conţinutul unui tub cu hemoliză, vom regăsi în sediment stroma hematiilor.

Analizînd mecanismul reacţiei de hemoliză, Bordet a stabilit că realizarea ei este condiţionată de prezenţa în amestec a unui al treilea element, nespecific, alexina sau complementul, întocmai ca la fenomenul de bacterioliză. Anticorpul specific din serul imun, care este termostabil, acționează asupra antigenului-celulă reprezentat de hematie și-l sensibilizează pentru acțiunea ulterioară de permeabilizare a membranei hematiei, pe care o realizează alexina. Alexina sau complementul este un factor termolabil; ea se inactivează ușor, prin încălzire la 56° și activitatea alexică a serului dispare. De asemenea, prin păstrarea îndelungată a serului titrul alexic scade treptat.

În cazul că serul imun antihematii de oaie pe care-l folosim este păstrat timp îndelungat sau dacă îl încălzim 30 de minute la 56°, el pierde alexina, dar păstrează anticorpii sensibilizanți termostabili. Punînd în contact suspensia de hematii și anticorpii antihematii de oaie și menținînd amestecul la 37°, aceștia din urmă acționează asupra hematiilor-antigen și le sensibilizează pentru acțiunea ulterioară a alexinei, pe care o realizăm prin adăugarea în amestec a unei cantități de ser proaspăt de cobai.

Deci și la reacția de hemoliză, analog celei de bacterioliză, mecanismul de realizare a reacției se desfășoară în două faze. Prima fază este reprezentată de unirea anticorpilor specifici antihematii de oaie cu antigenul hematie, denumită fază de sensibilizare a antigenului sau faza specifică. Această primă fază este vizibilă cu ochiul liber, amestecul păstrîndu-și opalescența inițială.

În cea de-a doua fază a reacției, nespecifică, se produce acțiunea alexinei, care, prin acțiunea asupra membranei sensibilizate de anticorp, permite desprinderea hemoglobinei de pe stroma hematiilor și trecerea ei în soluție, care se traduce cu limpezirea amestecului, apariția hemolizei.

Prepararea și titrarea unui ser hemolitic. Pentru realizarea reacției de hemoliză sînt necesare, așa cum am văzut, 3 elemente: hematiile, serul specific antihematii, denumit obișnuit și ser hemolitic sau sensibilizatrice și alexina sau complementul.

În cele de mai jos vom da indicațiile necesare obținerii și pregătirii acestor 3 elemente, pentru a fi utilizate în reacția de hemoliză.

Obținerea și prepararea suspensiei de hematii. Se recoltează prin puncția venei jugulare la berbec o cantitate de sînge de aproximativ 100 ml, într-un balon cu perle de sticlă. Balonul se agită continuu, pentru a realiza defibrinarea sîngelui. Sîngele defibrinat se centrifughează 10 minute la 2 000 ture/minut, se îndepărtează prin decantare serul supernatant și se înlocuiește cu soluție NaCl $8,5^0/_{00}$. Se centrifughează și se înlocuiește din nou supernatantul cu soluție NaCl $8,5^0/_{00}$, repetînd de 3—4 ori această operație de „spălare'' a hematiilor, pînă cînd lichidul supernatant, obținut după centrifugare, devine limpede și incolor. După această ultimă spălare, depozitul de globule roșii este readus la volumul inițial cu soluție NaCl $8,5^0/_{00}$ și poate fi inoculat la iepure. Suspensia de globule spălate poate fi păstrată la ghețar maximum 24 de ore. Depozitul de globule, fără a fi spălat, poate fi păstrat timp de două săptămîni în lichidul conservant Alsever, sterilizat prin filtrare:

Dextroză anhidră	18,66 g
Citrat trisodic + 5 H_2O	6,99 g
Clorură de Na	4,18 g
Apă distilată	1 000 ml

Prepararea serului hemolitic. Se injectează în trei reprize la interval de 4—5 zile, în vena marginală a urechii a doi iepuri, următoarele doze de globule roșii spălate și aduse la volumul inițial: 5 ml, 3 ml și 2 ml. Între a doua și a treia injecție este util să facem o desensibilizare a animalelor, folosind 1 ml globule roșii diluate 1/10.

La o săptămînă după ultima injecție se face sîngerarea de probă și se controlează titrul serului hemolitic obținut. Dacă titrul este suficient de ridicat, se face sîngerarea totală a animalului, prin puncție cardiacă sau prin puncția carotidei. După recoltarea și coagularea sîngelui se decantează serul, se clarifică prin centrifugare 10 minute la 2 000 ture/min. și se inactivează 30 de minute la 56°. Apoi se titrează și se fiolează în fiole sterile, care se pot păstra timp îndelungat la ghețar.

Obținerea și prepararea alexinei. Alexina sau complementul este reprezentat de serul proaspăt, recoltat de la cobai normali. Pentru că există variații individuale ale titrului alexic de la animal la animal, în practică se amestecă sîngele recoltat prin puncție cardiacă, în cantități de 5 — 8 ml, de la cîțiva cobai sănătoși. După recoltarea și coagularea sîngelui, se decantează serul și se clarifică prin centrifugare, apoi se păstrează la ghețar. Alexina obținută poate fi utilizată timp de 1 săptămînă, după care interval titrul alexic al serului scade mult prin învechire.

Titrarea serului hemolitic. Serul hemolitic antihematii de oaie, așa cum a fost preparat, se folosește în practică pentru realizarea sistemului hemolitic, care are rol de indicator în reacțiile de fixare a complementului.

Ingredientele necesare titrării se prepară astfel: depozitul de globule roșii de oaie, spălate, se suspendă în proporție de 1,5% în soluție clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$; alexina de cobai se diluează în proporție de 1/10 soluție clorurosodică; din serul hemolitic de titrat se fac diluții succesive, începînd cu diluția 1/1 000, 1/1 500, 1/2 000, 1/2 500, 1/3 000.

Pentru efectuarea diluțiilor de ser hemolitic se folosesc 9 ml soluție clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$, la care se adaugă 1 ml ser hemolitic de titrat, diluat 1/100; se amestecă bine și din această diluție de 1/1 000 se distribuie în 5 tuburi mari cantitățile din tabelul 99.

TABELUL 99

Tubul nr.	1	2	3	4	5
	ml				
Soluție clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$	—	0,5	1	1,5	2
Ser hemolitic 1/1 000	1	1	1	1	1
Diluția realizată	1/1 000	1/1 500	1/2 000	1/2 500	1/3 000

Se amestecă bine și se obțin astfel diluțiile indicate în tabel. În 7 tuburi de hemoliză se repartizează cîte 1 ml din fiecare diluție, pornind de la diluția cea mai mare, adică diluția de 1/3 000 în tubul nr. 5, diluția 1/2 500 în tubul nr. 4, și așa mai departe, pînă la diluția de 1/1 000 în tubul nr. 1. În tubul nr. 6 se repartizează 1 ml soluție clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$, iar în tubul nr. 7, 1,5 ml soluție clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$ și constituie tuburile martor ale titrării.

Se adaugă în fiecare tub 1 ml suspensie de globule roșii de oaie 1,5%. Se amestecă bine prin agitare și se așază tuburile la termostat o jumătate de oră.

Se adaugă apoi în primele 6 tuburi cîte 0,5 ml ser proaspăt de cobai, în diluție de 1/10, se agită și se așază din nou tuburile la termostat pentru 30 de minute.

În tuburile nr. 1 — 3 se produce hemoliza, care se manifestă prin apariția unei colorații roșii-smeurii și limpezirea amestecului. Intensitatea acestei hemolize scade de la stînga la dreapta, pe măsură ce crește diluția, adică scade cantitatea de anticorp. Diluția ultimului tub cu hemoliză completă reprezintă titrul serului. În tuburile nr. 6 și 7, care sînt martori, nu trebuie să se producă hemoliză. Tubul nr. 6 reprezintă martorul care arată dacă alexina utilizată și-a păstrat activitatea.

Tubul nr. 7 reprezintă martorul care indică dacă hematiile folosite sînt de calitate bună sau prezintă o fragilitate anormală.

Unitatea hemolitică este cantitatea minimă de hemolizină, adică de anticorp cu acțiune hemolitică, care, într-un volum total de 2,5 ml și în prezența de 0,5 ml alexină diluată 1/10, a lizat complet, în 30 de minute, la temperatura de 37°, 1 ml din suspensia de globule roșii 1,5%.

REACȚIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI

În anumite situații, datorită naturii antigenului, combinarea între acesta și anticorpul specific nu se manifestă într-o formă vizibilă, ca în reacțiile serologice studiate pînă în prezent. De exemplu, antigenele virale și rickettsiene sînt formate din elemente prea mici pentru a da complexe secundare vizibile prin aglutinare. Aceste antigene se obțin greu sub formă pură, fiind amestecate cu elementele nespecifice din țesuturile pe care au fost cultivate. Din această cauză nu sînt întotdeauna propice folosirii lor în reacții de precipitare. Un mare număr de specii microbiene nu sînt lizabile. Anumite specii bacteriene, care în forma lor virulentă

TABELUL 100

Tubul nr.	1	2	3	4	5	6	7
	ml						
Soluție clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$	—	—	—	—	—	1	1,5
Ser hemolitic	1	1	1	1	1	—	—
din diluția	1/1 000	1/1 500	1/2 000	1/2 500	1/3 000	—	—
Hematii 1,5%	1	1	1	1	1	1	1
	Termostatare o jumătate de oră						
Alexină diluată 1/10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Termostatare 30 de minute, la 37°						

se prezintă cu colonii de tip R, aglutinează spontan și astfel nu pot fi folosite în reacțiile specifice de aglutinare. Pentru punerea în evidență a unor cantități foarte mici de anticorpi specifici, unele dintre reacțiile antigen-anticorp, studiate pînă în prezent, nu sînt suficient de sensibile.

În toate aceste cazuri diagnosticul serologic se poate baza pe o altă formă de manifestare a reacției antigen-anticorp, cunoscută sub numele de reacție de fixare a complementului sau prescurtat R.F.C.

Principiul R.F.C. se bazează pe constatarea că ori de cîte ori combinarea antigenului cu anticorpul specific se petrece în prezența complementului, acesta din urmă se fixează pe complexul format. În consecință, dacă punem în evidență fixarea complementului, dovedim dispariția lui din amestec, ca entitate liberă și, indirect, combinarea antigenului cu anticorpul specific. În cazul particular cînd antigenul folosit este o celulă lizabilă, fixarea complementului pe complexul antigen-anticorp se manifestă sub forma vizibilă de liză. În toate celelalte cazuri însă, fixarea complementului pe complexul antigen-anticorp nu se manifestă sub o formă vizibilă și atunci sîntem nevoiți să recurgem la o tehnică de R.F.C., în care fixarea complementului sau dispariția lui din amestec se pune în evidență printr-un artificiu de tehnică serologică, care constă în introducerea în reacție a unui al doilea sistem antigen-anticorp, cu rol de sistem indicator, la care liza se produce sub formă vizibilă.

În practica microbiologică R.F.C. servește ca metodă de diagnostic în : viroze, sifilis, leptospiroze, rickettsioze, tuse convulsivă, febră tifoidă, bruceloză, tifos exantematic etc.

Sistemul indicator folosit este reprezentat de un cuplu specific antigen-anticorp, format din globule roșii de oaie și ser hemolitic anti-oaie. Acest cuplu este numit sistem hemolitic.

În prezența alexinei, hematiile de oaie sensibilizate de serul hemolitic prezintă o modificare vizibilă, hemoliza.

În absența alexinei, hematiile de oaie combinate cu anticorpul din serul hemolitic rămîn nehemolizate.

Mecanismul reacției R.F.C. poate fi schematizat astfel :

I. Sistemul antigen-anticorp de determinat	Antigen cunoscut . . .	Ser de cercetat (anticorp specific prezent)
	↑ Complement	
II. Sistemul hemolitic indicator	Hematii de oaie . . .	Ser antihematii de oaie

I. Sistemul antigen-anticorp de determinat	Antigen cunoscut	Ser de cercetat (fără anticorpi specifici)
	Complement ↓	
II. Sistemul hemolitic indicator	Hematii de oaie . . .	Ser antihematii de oaie

Din această schemă apar cele două modalități ale reacției :

I. Dacă în sistemul de determinat serul de cercetat conține anticorpi specifici și, în consecință, are loc combinarea antigenului cu anticorpul și fixarea complementului pe complexul antigen-anticorp format, hematiile din sistemul indicator, combinate cu anticorpul hemolitic nu vor fi lizate, din cauza absenței din amestec a complementului ; lipsă de hemoliză = reacție pozitivă.

II. Dacă în sistemul de determinat lipsește din serul de cercetat anticorpul specific corespunzător antigenului folosit și în consecință, nu are loc combinarea antigenului cu anticorpul, complementul rămas liber în amestec se fixează pe hematiile sensibilizate din sistemul indicator, producînd liza acestora ; hemoliză = reacție negativă.

Din aceste motive reiese că este necesar ca reacția să se desfășoare în două etape. Întîi se pune în contact cu complementul sistemul antigen-anticorp de cercetat, în care se găsește factorul necunoscut și numai după aceea se adaugă sistemul hemolitic, care reprezintă a doua etapă a reacției.

Mai rezultă de aici, că în principiu, R.F.C. poate servi, atît la punerea în evidență a unui anticorp necunoscut, utilizînd un antigen cunoscut, cît și la identificarea unui antigen necunoscut, folosind un ser imun cunoscut. În practică, R.F.C. servește mai ales pentru determinarea prezenței anticorpilor dintr-un ser de cercetat.

Materiale necesare în R.F.C.

1. antigenul poate fi o suspensie microbiană, un antigen solubil, ca extractele microbiene, extractele de țesuturi normale sau patologice suspensiile virale sau rickettsiene etc. ;

2. anticorpul este reprezentat de serul bolnavului, inactivat 30 de minute la 56°, pentru a-i distruge complementul ;

3. alexina, reprezentată de un ser proaspăt de cobai ;

4. *sistemul indicator hemolitic*, care este un amestec din suspensia de hematii de oaie și ser hemolitic de iepure antihematii de oaie.

Prepararea și titrarea alexinei. Întrucît s-a constatat, prin practica reacțiilor serologice, că serul de cobai este acela care ne furnizează un complement foarte activ, relativ fix, și în plus are și calitatea de a fi sărac în sensibilizatrice hemolitică anti-oaie, este recomandat a fi utilizat pentru toate seroreacțiile care folosesc alexină. Se recomandă folosirea unui amestec de seruri de la cel puțin 3 cobai. Se vor întrebuința numai cobai masculi, căci serul femelelor este mai sărac sau chiar lipsit de activitate complementară, cînd acestea sînt în faza de gestație sau în perioada de lactație. Se vor întrebuința, de preferință, cobai neîntrebuințați la alte experiențe prealabile, sănătoși, bine hrăniți și ținuți în condiții igienice. Se vor sîngera animalele în afara perioadei digestiei, prin puncție cardiacă. De la fiecare animal se pot recolta 5 – 10 ml sînge, după mărimea animalului.

Obișnuit, se recoltează cu 18–20 de ore înaintea practicării seroreacției, întrucît s-a observat că titrul alexinei variază în limite destul de importante în primele 4–5 ore după sîngerare.

Pentru a fi întrebuințat la efectuarea seroreacției, serul de cobai (alexina) trebuie totdeauna titrat înaintea practicării seroreacției, pentru a vedea care este cantitatea optimă de întrebuințat.

Pentru aceasta, se diluează 1/10 serul de cobai, luîndu-se de exemplu 0,5 ml alexină și 4,5 ml soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$.

Se așază 9 tuburi de hemoliză pe un stelaj de metal și se notează cu creionul dermatografic cantitățile crescînde de alexină care se vor repartiza în ele, începînd cu 0,05 și mărind, cu aceeași cantitate, la fiecare tub, pînă la 0,40. Ultimul tub este martor și se notează cu M.

Se repartizează alexina în cele 8 tuburi, cu excepția tubului martor. Se completează cu soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$ pînă la 1,5 ml, deci în tubul 1, cu 0,05 ml alexină diluată 1/10, se va completa cu 1,45 ml soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$, în tubul al 2-lea, cu 0,10 ml alexină diluată, se va repartiza 1,40 ml și așa mai departe. În tubul martor M se va introduce numai 1,5 ml soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$.

În toate tuburile, inclusiv martorul, se adaugă 1 ml de sistem hemolitic. Se agită bine și se pune la termostat timp de 15 minute.

TABELUL 101

Schema titrării alexinei

Nr. tubului	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ml								
Alexină diluată 1/10	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	M
Soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$	1,45	1,40	1,35	1,30	1,25	1,20	1,15	1,10	1,5
Sistem hemolitic	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Se menține 10 minute la baie sau termostat la 37°. Titrul alexinei este indicat de tubul care conține cantitatea cea mai mică de alexină, în care s-a produs o hemoliză totală. În reacția propriu-zisă se va lua cantitatea imediat superioară.

De exemplu, dacă titrul arată 0,20 ml alexină diluată 1/10 se va folosi în reacție 0,25 ml alexină diluată 1/10.

Prepararea sistemului hemolitic. Sistemul hemolitic se prepară în funcție de titrul serului hemolitic anti-oaie. În reacția de fixare a complementului se folosește totdeauna o cantitate de 4 ori mai mare decît cea reprezentată de titrul serului. De pildă, dacă titrul serului hemolitic este de 1/4 000, în reacție se va folosi diluția 1/1 000, adică de patru ori mai concentrat.

Elementele componente ale sistemului hemolitic se determină prin calcul. Dacă, de exemplu, cantitatea necesară de sistem hemolitic este de 300 ml, atunci calculul se face în felul următor:

— din suspensia de hematii care se folosește în concentrație de 1,5% în ser fiziologic, vom avea deci nevoie de 4,5 ml sediment de hematii;

— pentru a stabili cantitatea de ser hemolitic necesară celor 300 ml de amestec, ținem seama de faptul că titrul serului, de 1/4 000, adică 1 ml din diluția de ser hemolitic 1/4 000, hemolizează 1 ml din suspensia 1,5% globule roșii. În aceste condiții, 1 ml din serul hemolitic nediluat va hemoliza o cantitate de 4 000 ml din suspensia de hematii 1,5%. Cum însă în R.F.C. se lucrează cu o cantitate de ser de 4 ori mai concentrată, vom efectua calculul ca și cum 1 ml de ser hemolitic nediluat hemolizează numai 1 000 ml suspensie globule roșii 1,5%. Deci, pentru 300 ml de suspensie de globule roșii 1,5% vom avea nevoie de 0,3 ml ser hemolitic nediluat. În practică însă se lucrează cu ser hemolitic diluat 1/10 și atunci vom avea nevoie de 3 ml de ser hemolitic diluat 1/10 pentru cantitatea de 300 ml sistem hemolitic.

Din volumul total de 300 ml sistem hemolitic se scade volumul sedimentului de hematii, adică 4,5 ml, și al serului hemolitic, 3 ml. Așadar, pentru realizarea amestecului de sistem hemolitic în volum de 300 ml vom utiliza:

— 4,5 ml sediment de globule roșii spălate;

— 3 ml ser hemolitic cu titrul 1/400 diluat 1/10;

— 292,5 ml soluție NaCl $8{,}5^0/_{00}$.

Pentru realizarea unui sistem hemolitic de calitate, este util să repartizăm cantitatea de ser fiziologic în părți egale în 2 flacoane Erlenmeyer. În unul se adaugă hematiile, iar în celălalt serul hemolitic, apoi se amestecă brusc și se omogenizează prin agitare, după care se așază la termostat cu 30 de minute înainte de întrebuințarea în R.F.C., pentru a sensibiliza hematiile.

Titrarea antigenului. Pentru ca o suspensie microbiană sau alt produs să poată fi folosit ca antigen într-o reacție de fixare a complementului, trebuie să i se titreze în prealabil puterea anticomplementară și valoarea antigenică.

Stabilirea puterii anticomplementare a antigenului. Antigenele pot, în anumite proporții, să fixeze nespecific o cantitate de alexină, chiar în lipsa anticorpului specific. Aceasta constituie puterea anticomplementară a antigenului. Pentru ca antigenul să nu fixeze nespecific alexina și astfel să împiedice hemoliza, dînd un rezultat fals pozitiv, este necesar să titrăm în prealabil puterea anticomplementară a antigenului cu care lucrăm și să-l folosim în reacție în proporții situate în afara zonei de acțiune anticomplementară.

Prin stabilirea puterii anticomplementare a antigenului se determină cantitatea maximă de antigen care, în absența anticorpului specific, nu fixează alexina.

Tehnica reacției. Într-o serie de tuburi de hemoliză se repartizează cantități crescînde din suspensia antigenică de titrat, începînd cu 0,1, 0,2, 0,3 ml etc., și cantități egale de alexină diluată 1/10, reprezentînd cantitatea imediat superioară unității alexice determinate prin titrare în aceeași zi. Se completează cu soluție clorurosodică $8{,}5^0/_{00}$ pînă la volumul total de 1,5 ml pe tub și se așază la termostat timp de 60 de minute. Apoi se scot tuburile și se adaugă în fiecare tub cîte 1 ml de sistem hemolitic. Se termostatează din nou timp de 30 de minute și se face citirea reacției. Tuburile nr. 8 și 9 reprezintă martori pentru alexină și sistemul hemolitic.

TABELUL 102

Tuburi	Suspensie de antigen (ml)	Alexină (ml)	Soluție clorurosodică $8{,}5^0/_{00}$ (ml)	Sistem hemolitic (ml)
1	1	0,5	—	1
2	0,6	0,5	0,4	1
3	0,5	0,5	0,5	1
4	0,4	0,5	0,6	1
5	0,3	0,5	0,7	1
6	0,2	0,5	0,8	1
7	0,1	0,5	0,9	1
8	—	0,5	1	1
9	—	—	1,5	1
Se agită și se mențin 60 de minute la termostat				Se agită și se mențin 30 de minute la termostat

Titrul puterii anticomplementare este dat de prima eprubetă în care s-a produs hemoliza totală. Să presupunem că 0,4 ml de antigen reprezintă cantitatea maximă de antigen care nu a împiedicat hemoliza. Aceasta denotă că doza de 0,4 ml este cantitatea maximă de antigen lipsită de putere anticomplementară. Peste această doză, antigenul fixează nespecific alexina și deci în R.F.C. vom utiliza numai valori inferioare celei de 0,4 ml antigen. Dacă în reacția de titrare se întîmplă ca toate cantitățile de antigen să fixeze alexina și să nu avem hemoliză totală în nici un tub, trebuie să refacem reacția, diluînd antigenul 1/2, 1/3 etc.

Titrarea valorii antigenice. Valoarea antigenică este cantitatea minimă de antigen care în prezența anticorpului specific fixează complementul. Pentru a determina valoarea antigenică, se stabilește prin titrare această cantitate minimă, care apoi se folosește în reacția de fixare a complementului.

Titrarea valorii antigenice se face prin comparație cu un ser imun specific antigenului, cu un conţinut cunoscut de anticorpi. Valoarea antigenului va fi cu atît mai ridicată, cu cît va permite decelarea unei cantităţi mai mari de anticorp, în serul de cercetat.

Tehnica reacţiei. Într-o serie de tuburi de hemoliză se repartizează cantităţi crescînde, 0,1, 0,2, 0,3 ml din diluţia de antigen căreia dorim să-i stabilim valoarea antigenică. Adăugăm în fiecare tub o cantitate constantă de ser specific cunoscut, cantitatea de alexină diluată 1/10 stabilită prin titrare şi soluţie clorurosodică $8,5\,^0/_{00}$, pentru a aduce amestecul la volumul de 1,5 ml pe tub. Se menţine pentru sensibilizare 60 de minute la 37°, apoi se scoate şi se adaugă cîte 1 ml de sistem hemolitic. Se incubează din nou la termostat 30 de minute la 37° şi se face citirea reacţiei.

Titrul reacţiei este dat de ultimul tub în care nu s-a produs hemoliza, deci nu a fost fixată alexina.

Pentru ca un antigen să fie considerat ca valoare antigenică ridicată, el trebuie să fixeze în cantităţi cît mai mici, în prezenţa anticorpului specific, alexina. Deci, cu cît cantitatea de antigen sensibilizat care fixează alexina este mai mică, cu atît puterea antigenică este mai mare.

TABELUL 103

Tuburi	Antigen diluat 1/10 (ml)	Ser antitific diluat 1/20 (ml)	Alexină la titrul zilei (ml)	Soluţie cloruro-sodică $8,5\,^0/_{00}$ (ml)	Sistem hemolitic (ml)
1	0,5	0,5	0,5	—	1
2	0,4	0,5	0,5	0,1	1
3	0,3	0,5	0,5	0,2	1
4	0,2	0,5	0,5	0,3	1
5	0,1	0,5	0,5	0,4	1
6	0,05	0,5	0,5	0,4	1
7	—	0,5	0,5	0,5	1
8	—	0,5	—	1	1
9	—	—	—	1,5	1
(Se agită şi se menţine 60 de minute la termostat)					(Se agită şi se menţine 30 de minute la termostat)

Datorită faptului că valoarea antigenică a unui antigen nu este supusă la variaţii prin păstrare şi astfel se menţine stabilă timp îndelungat, titrarea antigenului se face numai o dată cu ocazia preparării. În R.F.C. se foloseşte un singur martor antigen pentru puterea anticomplementară.

Un antigen pe care îl folosim în R.F.C. este de bună calitate, dacă doza minimă, în care are o acţiune anticomplementară, este de cel puţin 2—3 ori mai mare decît titrul valorii sale antigenice.

Tehnica reacţiei de fixare a complementului. În R.F.C. folosim cantităţile necesare din elementele reacţiei stabilite prin titrare prealabilă. Pe lîngă tuburile reacţiei propriu-zise, folosim o serie de martori, pentru a avea controlul desfăşurării reacţiei şi a evita greşelile de interpretare, datorite unei alterări accidentale a unor elemente dintre cele folosite în reacţie.

Elementele reacţiei:

— Antigen cunoscut şi titrat. De exemplu, suspensie diluată 1/10 dintr-o cultură de 24 de ore de bacili tifici.

— Ser de cercetat : ser sanguin de la bolnav, inactivat 30 de minute, la 52°.

— Ser imun : ser antitific cu titru cunoscut, inactivat 30 de minute, la 52°.

— Ser normal : ser sanguin normal, lipsit de anticorpi antitifici, inactivat 30 de minute, la 52°.

— Alexină de cobai diluată 1/10, titrată în aceeaşi zi.

— Soluţie clorurosodică $8,5\,^0/_{00}$.

— Sistem hemolitic, preparat în ziua reacţiei şi sensibilizat cu puţin timp înaintea reacţiei.

Dispozitivul reacţiei de fixare a complementului este cel din tabelul 104.

Rezultatul depinde de comportarea primelor 2 tuburi, considerînd că eprubetele de control se comportă conform aşteptărilor.

Lipsa de hemoliză în tuburile nr. 1 şi 2 = R.F.C. pozitivă, deoarece alexina a fost fixată de cuplu antigen + anticorp specific din serul de cercetat.

Apariţia hemolizei în tuburile nr. 1 şi 2 = R.F.C. negativă. Anticorpul specific lipseşte din serul de cercetat, alexina a rămas liberă şi s-a fixat pe sistemul hemolitic indicator al reacţiei.

Notarea intensităţii reacţiei se face în felul următor :

++++ absenţa totală a hemolizei, sediment de hematii, supernatant incolor ;

+++ absenţa hemolizei, sediment de hematii, supernatant roz ;

++ hemoliză intensă, sediment mic de hematii, supernatant colorat roz ;

+ hemoliză intensă, urme de sediment de hematii, supernatant intens colorat ;

± dubios, uşoară hemoliză, fără sediment.

Semnificaţia martorilor :

Tubul nr. 3 = martor pentru puterea anticomplementară a serului de cercetat. Uneori serul poate avea putere anticomplementară,

TABELUL 104

Nr. tubului	1	2	3	4	5	6	7	8
	ml							
Antigen	0,2	0,2	—	0,4	0,2	0,2	—	—
Ser de cercetat	0,2	0,3	0,3	—	—	—	—	—
Ser imun	—	—	—	—	0,3	—	—	—
Ser normal	—	—	—	—	—	0,3	—	—
Alexină	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Soluție clorurosodică 8,5‰	0,6	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5	1	1,5
	Tuburile se agită bine și se pun la termostat 60 de minute							
Sistem hemolitic	1	1	1	1	1	1	1	1
	Se agită din nou și se pun la termostat 30 de minute							
Rezultat pozitiv	—	—	liză	liză	—	liză	liză	—
Rezultat negativ	liză	liză	liză	liză	—	liză	liză	—

rareori serurile umane, cînd sînt bogate în lipoizi, frecvent serurile de animal, iepure și cîine.

Tubul nr. 4 = martor pentru puterea anticomplementară a antigenului. Antigenul se repartizează în cantitate dublă, pentru a vedea dacă singur nu fixează complementul.

Tubul nr. 5 = martor sigur pozitiv cu un ser imun, care conține sigur anticorpi specifici.

Tubul nr. 6 = martor sigur negativ cu ser normal.

Tubul nr. 7 = martorul conservării titrului complementului. Deși titrarea complementului se face în aceeași zi, nu ne putem lipsi de acest martor pentru a evita interpretări greșite, din cauza eventualei alterări a acestuia în cursul manipulării.

Tubul nr. 8 = martor pentru sistemul hemolitic, pentru a controla calitatea globulelor roșii și a evita o hemoliză nespecifică a hematiilor.

Cînd apare fixarea complementului în tubul nr. 3, reacția este apreciată ca anticomplementară. Este vorba deci, de o reacție nespecifică datorită puterii anticomplementare a serului de cercetat. În aceste situații se reface întreaga reacție cu serul de cercetat diluat.

REACȚIA OPSONO-FAGOCITARĂ

Interrelația dintre procesele celulare de imunitate și cele umorale a fost făcută încă din 1895, cînd Denys și Leclef au semnalat pentru prima oară prezența în serurile imune, a unor substanțe cu acțiune sensibilizantă asupra bacteriilor, făcîndu-le prin aceasta mai ușor fagocitabile.

În 1903, Wright și Douglas arată că substanțe cu aceeași acțiune de sensibilizare a bacteriilor pentru procesul fagocitar se găsesc și în serul normal și le numesc opsonine, de la cuvîntul grec „opsao" = pregătesc pentru mîncare. Opsoninele din serul imun sînt termostabile, asemănătoare celorlalți anticorpi și au acțiune specifică asupra bacteriilor. Din aceste considerente au fost numite imunoopsonine, tropine sau bacteriotropine, spre a le diferenția astfel de opsoninele prezente în serul normal, termolabile și cu acțiune asupra bacteriilor în general și mai puțin asupra unei anumite bacterii, care a provocat infecția.

Cercetările ulterioare au confirmat primele afirmații în privința imunoopsoninelor. S-a constatat însă că acțiunea opsonizantă a serurilor normale este datorită colaborării a 2 factori: unul termostabil, mai mult sau mai puțin specific, care se găsește în cantitate mică, și al doilea, alexina, indispensabilă procesului de opsonizare în serul normal, cu rol de a intensifica acțiunea primului factor. Dintre componentele alexinei s-a constatat că singură fracțiunea C_4 nu este necesară procesului de opsonizare. S-a mai stabilit, de asemenea, că alexina influențează și acțiunea opsoninelor imune, dar nu în aceeași măsură ca în cazul opsoninelor normale.

Azi se admite faptul că, prezența alexinei este indispensabilă numai pentru acțiunea opsoninelor normale, revenindu-i un rol de minimă importanță în cazul imunoopsoninelor, deoarece bacteriotropinele singure, ar fi capabile, să producă acțiunea opsonizantă.

În privința deosebirii dintre opsoninele normale și imunoopsonine sînt emise două ipoteze : una admite că opsoninele normale sînt complet diferite de cele imune, alta că substanțele termostabile din serurile normale sînt în fond identice cu cele din serurile imune, existînd doar diferențe cantitative.

Această ultimă ipoteză a fost susținută datorită următoarelor constatări :

– opsoninele normale, ca și imunoopsoninele pot fi adesea adsorbite specific ;

– opsoninele serurilor normale sînt și ele termostabile, dar se găsesc în cantități mici, fapt care le împiedică activitatea la diluții mari de ser. Ele își recapătă puterea opsonizantă inițială prin adăugarea de cantități minime de alexină ;

– acțiunea opsonizantă a serurilor imune este și ea intensificată de alexină, dar acestea, în absența alexinei nu își pierd niciodată complet proprietatea de opsonizare.

Totuși o serie de diferențe, ca specificitatea mai redusă a opsoninelor normale, faptul că ele pot fi adsorbite cu mult mai greu din ser, și faptul că opsoninele imune, chiar dacă sînt potențate de alexină, nu rămîn niciodată complet inactive în absența acesteia, fac ca această problemă să fie încă controversată.

În ceea ce privește mecanismul de acțiune a opsoninelor și imunoopsoninelor, s-a arătat că prin fixarea acestora de suprafața celulei microbiene se produc, la acest nivel, modificări fizico-chimice în urma cărora bacteria va adera mai ușor de suprafața fagocitului. Modificările principale pe care le suferă microbii par să fie datorite scăderii potențialului electro-negativ celular.

În practică, prezența opsoninelor în ser se decelează prin determinarea puterii opsonice a serului și prin calcularea indicelui opsono-citofagic.

Tehnica reacției opsono-citofagice. Pentru reacție sînt necesare următoarele elemente :

– leucocite provenite din sînge uman sau exsudat peritoneal de la cobai ;

– suspensie microbiană, între 1 și 4 miliarde bacterii pe ml, în funcție de specia microbiană aleasă ;

– ser de cercetat ;

– ser normal, martor.

Prepararea leucocitelor. Se folosesc leucocitele din sîngele uman. De obicei experimentatorul folosește leucocitele proprii sau leucocitele din exsudatul peritoneal de cobai.

În cazul folosirii leucocitelor din sîngele uman se recoltează într-o pipetă circa 20 de picături de sînge cu un ac de seringă steril sau cu un vaccinostil prin înțeparea feței dorsale a unui deget, după ce în prealabil a fost ligaturat la baza sa. Se amestecă sîngele recoltat cu o soluție anticoagulantă, în proporție de 8–10 părți soluție și o parte sînge.

Soluția anticoagulantă întrebuințată va fi :

Clorură de sodiu	8,5g
Citrat de sodiu	15 g
Apă distilată	1 000 ml

Amestecul de sînge și soluția anticoagulantă se centrifughează, se îndepărtează supernatantul, iar depozitul se spală de trei ori, prin centrifugare cu cîte 10 ml soluție clorurosodică 8,5‰. Se îndepărtează lichidul de spălare. Depozitul rămas va prezenta un strat superficial, format din leucocite și un strat profund, format din globule roșii. Se înclină tubul și se aspiră cu o pipetă bine efilată leucocitele, apoi se depun într-un tub de precipitare sau în tub cu calibru mic. Pentru recoltarea leucocitelor de cobai se provoacă la cobai un exsudat peritoneal, prin inoculare intraperitoneală de 30 ml bulion steril. După 1–2 ore se puncționează peritoneul cobaiului și se recoltează exsudatul bogat în leucocite. Și aici recoltarea se face în soluție anticoagulantă și leucocitele astfel obținute sînt spălate cu soluție clorurosodică 8,5‰ prin centrifugări repetate, ca în cazul leucocitelor din sîngele periferic.

Prepararea suspensiei microbiene. Se prepară o suspensie omogenă în ser fiziologic dintr-o cultură tînără de 12–24 de ore. Dacă folosim o tulpină de *Brucella*, această suspensie trebuie să aibă 4 miliarde de germeni/ml.

Serul de cercetat. Se recoltează sînge din pulpa degetului într-o pipetă îndoită. Se lasă la termostat 2–3 ore, pentru separarea cheagului de ser, se secționează tubul și se recoltează serul clar. Serul se poate păstra la ghețar 3–4 zile. Serul martor se recoltează de la un individ sănătos, folosind aceeași tehnică.

Tehnica reacției:

1. Se amestecă, în cantități egale, serul, suspensia de germeni și leucocitele.

Se aşază la termostat timp de 20 de minute.

Se fac din acest amestec frotiuri pe lame curate degresate, se usucă, se fixează cu alcool absolut, se colorează cu tionină, albastru de toluidină sau soluţie Giemsa.

În cazul bacilului Koch se face o coloraţie Ziehl, la 37°.

2. Se fac aceleaşi preparate, folosind în loc de serul de cercetat un ser normal martor.

Citirea rezultatelor: se examinează 100 de leucocite polinucleare, făcîndu-se suma numărului microbilor conţinuţi în fiecare leucocit. În cazul unui leucocit care nu a fagocitat nimic, se înscrie la calcul 0.

O suspensie microbiană este bine făcută cînd se obţine la martor un număr de 2—4 microbi fagocitaţi pe leucocit. Notarea se va face numai pentru leucocitele bine colorate şi distincte. În cazul unei fagocitări intense, cînd microbii sînt în număr prea mare şi nu pot fi număraţi, se va înscrie totdeauna cifra 9.

Puterea opsonică rezultă împărţind numărul de microbi găsiţi în 100 de polinucleare la 100.

Indicele opsonocitofagic se determină din raportul dintre puterea opsonică a serului de cercetat şi puterea opsonică a serului martor (normal).

Exemplu: în 100 de leucocite polinucleare s-au găsit 200 microbi. Puterea opsonică a serului va fi $\frac{200}{100} = 2$.

Dacă serul normal are puterea opsonică 2 şi serul de cercetat are puterea opsonică 3, indicele opsono-citofagic va fi egal cu:

$$\frac{\text{puterea opsonică a serului de cercetat}}{\text{puterea opsonică a serului martor}} = \frac{3}{2} = 1{,}5 =$$

= indice opsonocitofagic.

Metoda stabilirii indicelui opsonocitofagic se foloseşte în scop diagnostic şi prognostic în unele infecţii, ca bruceloza, tusea convulsivă etc.

BIBLIOGRAFIE

ADO A.D. — Antigenele, excitanţi neobişnuiţi ai sistemului nervos, Acad. Med. Nauk, S.S.S.R., Moscova, 1952.

BALŞ M. — Introducere la studiul bolilor infecţioase, Ed. medicală, Bucureşti, 1958, p. 217—230.

BALŞ M. — Noţiuni elementare pentru folosirea tehnicii anticorpilor fluorescenţi, *Microbiologia, (Bucureşti)*, 1961, nr. 5, p. 455—460.

BERNGOF — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, G. J. Sinai şi O. G. Birgher, Ed. ştiinţifică, Bucureşti, 1952. p. 165—183.

BOREK F. — The fluorescent antibody method in medical and biological research, *Bull. O.M.S.*, 1961, vol. 24, nr. 2, p. 249—256.

BOYD W. — Fundamentals of immunology, Ed. Interscience, New-York, 1956.

BURNET F. M., FENNER F. — The production of antibodies, Ed. Mc. Millan, Melbourne, 1949.

CALALB G., SORESCU MARIA, STĂNICĂ ECATERINA, SARAGEA ALICE, STOIAN CECILIA — Alexina liofilizată. *Microbiologie (Bucureşti)*, 1959, nr. 4, p. 365—370.

CALININ V. S. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, G. J. Sinai şi O. G. Birgher, Ed. ştiinţifică, Bucureşti, 1952, p. 131—164.

CUSHING J., CAMPBELL D. — Principles of immunology, Ed. Mc. Graw-Hill, New-York, 1957.

DOERR R. — Die Immunitätsforschung, Ed. Springer, Wien, 1959.

DUBOS R. J. — Bacterial and mycotic infections of man, Ed. Lppincott, Philadelphia, 1952.

DUBOS R. J. — The bacterial cell in its relation to problems of virulence, immunity and chemotherapy, Ed. Harward University Press, Cambridge, 1945.

DUCA E., MIRON A. — Formulă matematică simplă pentru prepararea diluţiilor serice, *Microbiologia, (Bucureşti)*, 1957, nr. 1, p. 75—98.

GASTINEL P., FASQUELLE R., BARBIER P. — Eléments d'immunologie générale, Ed. Masson, Paris, 1955.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, Ediţia a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 228—234.

GOLD E. R. — Imunologie practică, Ed. medicală, Bucureşti, 1957.

HALLMANN L. — Bakteriologie und serologie, Ediţia a 2-a Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 483—612.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approved Laboratory Tehniques, Ed. Appleton-Century, 1945, p. 616—642.

MIHALCU FLORICA — Colorarea imunofluorescentă, *Microbiologia, (Bucureşti)*, 1962, nr. 3, p. 209.

MACKIE J. T., MC. CARTNER E. J. — Handbook of practical bacteriology, Ediţia a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 230—243.

NESTORESCU N., OPRESCU C. C. — Bacteriologie medicală, (sub redacţia prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 298—306.

POPOVICI MARCELA, VLAD-SZÉGLI LUCIA. — Cercetări asupra variaţiei titrurilor serurilor aglutinante şi hemolitice in raport cu vechimea şi condiţiile de păstrat, *Microbiologia, (Bucureşti)*, 1957, nr. 4, p. 354—357.

RAFFEL S. — Immunity, Hypersensitivity, Serology, Ed. Appleton-Century, New-York, 1955.

TOPLEY and WILSON'S — Principles of bacteriology and immunity, vol I. Ediţia a 4-a, Ed. Edward Arnold, 1955, p. 221—280.

ZILBER A. L., — Bazele imunologiei, Ed. medicală, Bucureşti, 1959.

ZINSSER J., — Textbook of bacteriology, Ediţia a 11-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New-York, p. 143—168.

WHITBY L., HYNES M. — Medical bacteriology, Ediţia a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 51—102.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, p. 46—142.

. . . — Vaccinuri, seruri şi produse biologice de diagnostic, realizate de Institutul „Dr. I. Cantacuzino", Editura M.S.P.S., Bucurşti, 1962.

METODE DE IZOLARE ŞI DE IDENTIFICARE A MICROBILOR PATOGENI PRIN CONFERIREA INFECŢIEI EXPERIMENTALE

Animalele domestice sau sălbatice, folosite obişnuit în experimentările biologice, sînt cunoscute sub denumirea de ,,animale de laborator''. Între acestea, cele mai curent întrebuinţate sînt: cobaiul, iepurele, şoarecele şi şobolanul, şi numai în cazuri speciale şi alte specii animale (maimuţa, hamsterul, pisica, dihorul ş.a.).

1. **Cobaiul** (*Cavia cobaya*), cel mai des întrebuinţat, datorită sensibilităţii faţă de un mare număr de germeni patogeni, este un animal blînd şi deci, uşor de manipulat. Varietatea cu părul scurt este cea mai folosită.

Date fiziologice: maturitatea sexuală a cobaiului începe încă din luna a doua, cînd ambele sexe sînt apte pentru fecundare. Pentru reproducţie, se lasă în aceeaşi cuşcă un mascul pentru 5—6 femele. Gestaţia durează între 30 şi 35 de zile, după care femela naşte 2—3 pui, în mod excepţional chiar 5. În cursul unui an, femela poate purta 4—5 sarcini. După doi ani fecunditatea scade notabil, animalul devenind repede steril. Puii se nasc cu păr şi cu dinţi, şi după cîteva zile pot fi separaţi de mamă. Aceasta îşi alăptează puii 15—20 de zile, timp în care ei pot primi concomitent şi hrană obişnuită. Animalul atinge dezvoltarea maximă la vîrsta de 6 luni, cînd greutatea lui ajunge în jurul a 600 g. Durata vieţii animalului este de 3—5 ani.

Alimentaţia zilnică a cobaiului constă din ovăz (circa 100 g), lucernă sau sfeclă 400 g, morcovi 40 g. etc. El mănîncă mult, dar nu bea niciodată.

2. **Iepurele** (*Oryclalogus cuniculus*) este o specie cu mai multe rase (iepure comun, Chinchilla, Champagne, Flandra, Havana, Alaska etc.).

Date fiziologice: este apt pentru fecundare de la vîrsta de 4 luni; un mascul poate fecunda 10—12 femele. Durata gestaţiei este de 30—35 de zile; o femelă poate avea 3 gestaţii pe an. Ea poate naşte 3—10 pui, care se nasc orbi şi de-abia după o săptămînă îşi capătă vederea. După aproximativ o lună încep să mănînce iarbă, iar după 6 săptămîni pot fi lăsaţi în cuşcă împreună cu alţi pui. Animalul cîntăreşte, după o lună 500 g şi după 5 luni 1—2 kg. Alimentaţia este asemănătoare cu a cobaiului. Un iepure consumă zilnic aproximativ 600—800 g furaje verzi, ca lucernă sau trifoi; foi de varză sau salată 250 g; sfeclă sau morcov furajer 250 g.

3. **Şoarecele** (*Mus musculus*) este un animal de experienţă comod, datorită întreţinerii uşoare şi marii lui capacităţi de reproducere. Varietăţile albă şi cenuşie sînt cele mai întrebuinţate.

Date fiziologice: la vîrsta de 4 luni, animalul devine capabil de reproducere. Durata gestaţiei este de aproximativ 20 de zile, după care femela dă naştere la 4—6 pui orbi şi glabri, care pot fi separaţi de mamă de-abia după 3 săptămîni. Ei încep să vadă după 10—12 zile. Durata vieţii este de 3—4 ani.

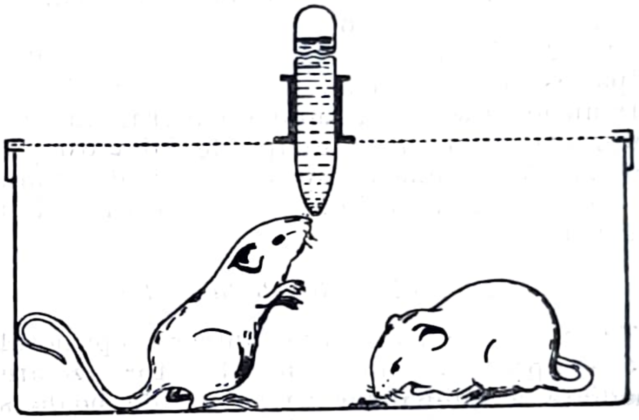


Fig. 272. — Borcan de sticlă cu capac din sită metalică, cu rezervor de apă pentru adăpostirea şoarecilor în experienţă.

Alimentaţia, în cantitate de 10—12 g pe zi, constă din boabe de grîu, ovăz, pîine muiată în lapte, resturi de sfeclă, morcov şi apă.

4. **Şobolanul** (*Rattus norvegicus*) este mai puţin folosit, varietatea ,,albinos'' fiind cea mai utilizată.

Date fiziologice: animalul devine apt pentru fecundare, de la vîrsta de 4 luni, gestaţia durînd 25—30 de zile, după care femela naşte 4—5 pui glabri, cu ochii închişi, care sînt alăptaţi de mamă timp de 2 săptămîni. Hrana este de aceeaşi calitate ca şi pentru şoareci, raţia fiind însă de 30—40 g de alimente.

Condiţiile de adăpostire şi îngrijire a animalelor de laborator au o importanţă deosebită pentru viabilitatea şi reactivitatea lor.

Condiţiile care trebuie asigurate spre a dispune de animale apte sînt următoarele:

Cuştile de adăpostire a animalelor de laborator trebuie construite din reţele de sîrmă, cu pardoseală din tablă galvanizată, cu grătar de lemn, astfel încît să permită curăţirea lor ușoară de resturile alimentare, urină, excremente, precum și dezinfectarea eficientă. Cuștile de lemn sînt mai puțin de recomandat. Ele trebuie spălate de 2—3 ori pe săptămînă, cu apă curgătoare și dezinfectate cu soluții antiseptice (creolină 5%, lizol 3%, cloramină 2—5% etc.). Așternutul animalelor (paiele, rumegușul de lemn) trebuie primenit cît mai des.

Ventilația trebuie asigurată în așa fel, încît prin evacuarea aerului viciat să se înlăture orice miros dezagreabil în crescătorie. Temperatura trebuie menținută cît mai constantă, indiferent de anotimp, în jurul a 18° pentru cobai, 25° pentru șoareci, 15—16° pentru iepuri.

Crescătoria însăși trebuie instalată într-o aripă separată a clădirii laboratorului, sau într-un local separat, anume construit în acest scop, situat cît mai aproape de laborator; ea trebuie să dispună de spațiu suficient, lumină și apă curentă, posibilități de aerisire și de încălzire.

Bolile animalelor de laborator

Trebuie bine cunoscute, întrucît epizootiile pot compromite munca de laborator. Izolarea imediată a animalelor cu semne de boală se impune, spre a preîntîmpina diseminarea bolii, care mai ales la animalele deja inoculate poate duce la pierderea lor prin infecție supraadăugată.

Animalele trebuie supravegheate continuu, în ce privește aspectul general, greutatea și temperatura.

Animalul normal este vioi și viguros; cel bolnav devine apatic, retras, are părul zburlit și lipsit de luciu, slăbește, respiră greu; temperatura, care în mod normal este de 39°5 la cobai, 39°7 la iepure etc. crește la animalul bolnav concomitent cu pierderea în greutate.

Microorganismele care pot infecta spontan animalele de laborator pot fi : bacterii, virusuri, ciuperci sau protozoare. Agenții externi care scad rezistența nespecifică a organismului, ca de pildă frigul, umezeala, variațiile bruște de temperatură, alimentația defectuoasă și promiscuitatea, declanșează sau contribuie, în largă măsură, la apariția epizootiilor. Contaminarea se realizează prin alimentele contaminate, dejecții, praf etc.

Dintre bolile infecto-contagioase comune cobaiului și iepurelui sînt de reținut ca mai importante :

„*Boala nasului*", sau catarul nazal contagios; este o inflamație acută a mucoasei nazale și sinuzale, care afectează și conjunctiva, complicîndu-se cel mai adesea cu congestie pulmonară. La cobai este produsă de 4 varietăți de germeni (*Pasteurella*, pneumococi, *Klebsiella* și *S. paratyphi B*), în vreme ce la iepure este provocată, în plus, și de *B. bronchisepticus*. În formele acute, apare o rinită acută, sero-purulentă, care evoluează spre ulcerație, și se acoperă de cruste. Apariția dispneei trădează complicațiile pulmonare, care duc la moarte după o săptămînă. În forma cronică, boala evoluează mai benign, și animalul se poate vindeca după cîteva săptămîni, rămînînd însă purtător de microbi.

Pasteureloza, foarte contagioasă, este determinată de microbi aparținînd genului *Pasteurella*. În formele acute apare o coriză sero-purulentă, urmată de fenomene pulmonare și intestinale, care duc la moartea animalului după aproximativ o săptămînă. În formele supraacute moartea survine după 24—48 de ore; în cele cronice apar abcese subcutanate care evoluează lent spre fistulizare și apoi spre vindecare lentă. Însămînțările din organe, inimă, splină, ficat confirmă diagnosticul.

Pseudotuberculoza este o infecție cauzată tot de o pasteurelă (*P. pseudotuberculosis rhodentium*), manifestată prin febră, somnolență, tulburări intestinale, dispnee, cașexie și moarte. La autopsie se constată hipertrofia și cazeificarea ganglionilor mezenterici, cu prezența pasteurelelor în organe, precum și prezența de tuberculi cazeificați în splină, ficat și epiploon.

Infecțiile pulmonare, în special cele provocate de pasteurele, constituie adesea o adevărată calamitate pentru crescătorii, decimînd animalele în scurtă vreme.

Tuberculoza apare foarte rar spontan la animalele de laborator, cu toată marea sensibilitate a unora dintre ele, ca de pildă cobaiul, față de infectarea experimentală.

Unele infecții pot afecta cu precădere anumite specii animale de laborator, astfel :

Cobaiul este în special sensibil la pneumonii cu *D. pneumoniae. Kl. pneumoniae* sau *B. bronchisepticus*, care duc la moartea animalului în 4—5 zile : bronhopneumonii cu pneumococ, care omoară animalul după 10—15 zile : salmoneloze cu *S. enteritidis*, *S. typhimurium* etc., acute sau cronice, sau diferite infecții streptococice, care se manifestă prin adenopatii supurate.

Iepurele face mai ales : pneumonii cu *D. pneumoniae* și *B. bronchisepticus*, bronhopneumonii pneumococice, rîie auriculară și cisticercoză hepatică și peritoneală.

Șoarecele este extrem de sensibil la infecția cu *Erysipelothrix muris septica*, care-i provoacă o septicemie urmată de moarte după 3—4 zile. Tot o septicemie severă este provocată și de *Kl. pneumoniae*, care servește și ca test pentru diagnosticul pneumoniei la om. Infecțiile cu streptococi și cu *S. typhimurium* constituie, de asemenea, cauze de mortalitate ridicată în crescătoriile de șoareci.

Șobolanul este sensibil în special la infecțiile cu pasteurele, pneumococi, *Salmonella typhimurium* și *S. enteritidis*.

Metodele de contenție a animalelor de laborator

Contenția animalelor, adică modul de manipulare în vederea experimentărilor, trebuie cunoscută în amănunt. Ea se realizează fie manual, fie prin aparate speciale.

Contenția manuală constă în prinderea și imobilizarea animalului, fără mișcări bruște și violente, evitînd totodată eventuale mușcături și zgîrieturi din partea acestuia.

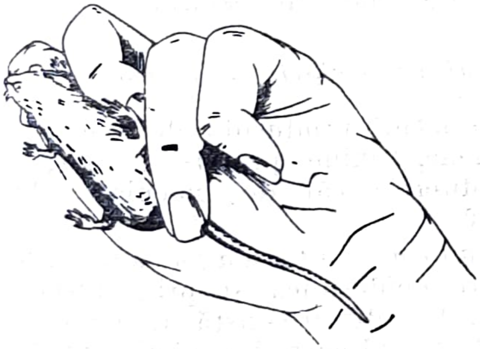


Fig. 273. — Contenția manuală a șoarecelui.

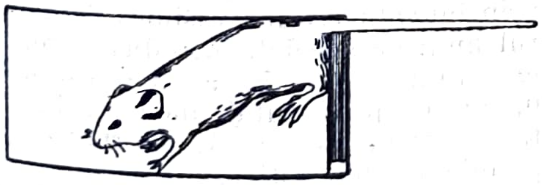


Fig. 274. — Sistem simplu de contenție a șoarecelui pentru injecție intracaudală.

La cobai, se prinde cu o mînă toracele și cu cealaltă labele posterioare.

La iepure, se prind cu o mînă labele posterioare, iar cu cealaltă i se strînge toracele cu cotul, după ce animalul a fost dat pe spate.

Șoarecelui și șobolanului li se prinde extremitatea cozii, după care animalul este pus pe masă și este apucat de pielea cozii cu degetele mîinii stîngi.

Contenția cu aparate se realizează prin fixarea animalelor pe diferite tipuri de planșete din metal și lemn, prevăzute cu dispozitive de fixare a capului și membrelor. Dintre aparatele de contenție, cel mai utilizat în practică este acela al lui Latapie. Marea mobilitate a acestui aparat permite fixarea animalului (iepure sau cobai), atît pe fața ventrală, cît și pe cea dorsală. Pentru contenția șoarecilor și a șobolanilor se folosește un cilindru metalic perforat, prevăzut la unul din capete cu un dop de plută, iar la celălalt cu un orificiu prin care poate trece coada animalului.

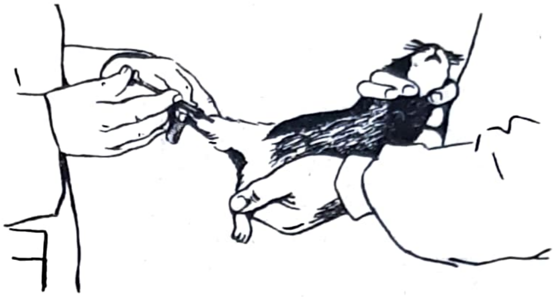


Fig. 275. — Contenția manuală a cobaiului pentru injectarea subcutanată la nivelul coapsei.

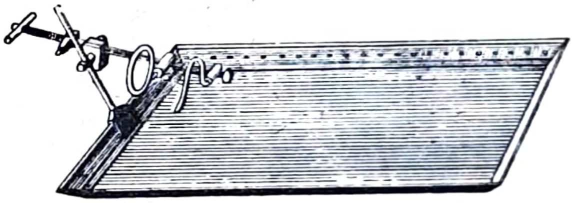


Fig. 276. — Dispozitiv de contenție a iepurilor și cobailor (după Malassez).

Anestezierea animalelor de laborator

Atunci cînd intervenția pe care o efectuăm asupra unui animal de laborator este de lungă durată, necesită un repaus complet al animalului și este dureroasă, este obligatoriu să anesteziem animalul. De obicei se folosește cloroformul sau eterul, sub forma unui tampon de vată îmbibat cu anestezic și așezat în fundul unei pîlnii de sticlă, care se aplică pe botul animalului.

Este bine ca din cînd în cînd să mai ridicăm puțin pîlnia, ca să pătrundă și aer, care să se amestece cu vaporii de anestezie.

Rozătoarele mici (cobaii, iepurii și șobolanii) pot fi anesteziate în bune condiții, așezîndu-le sub un clopot de sticlă. De îndată ce animalul a adormit, se scoate de sub clopot și se întreține starea de anestezie cu ajutorul procedeului mai sus indicat.

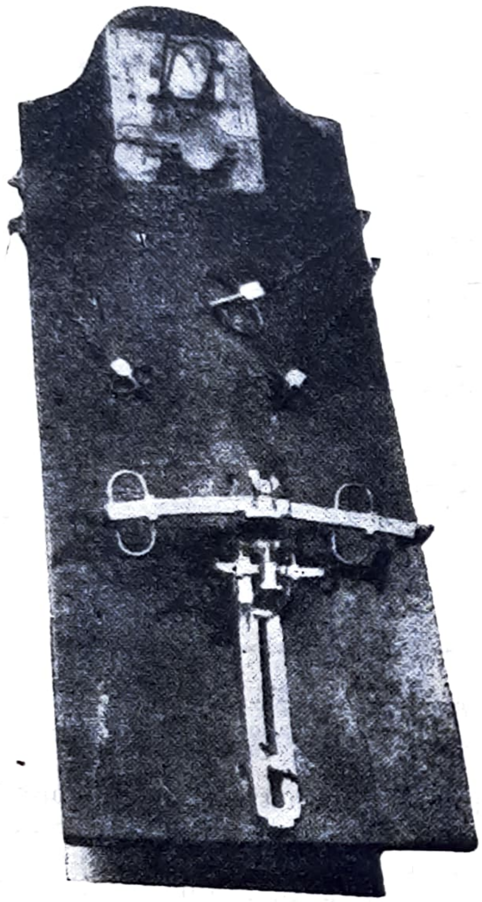


Fig. 277. — Aparat de contenție tip Latapie.

În afara anesteziei prin inhalație se poate folosi anestezia pe cale intraperitoneală cu cloral hidrat sau uretan ; soluția de cloral hidrat după formula următoare :

Cloralhidrat	2 g
Clorhidrat de morfină	0.01 g
Apă distilată	100 ml

Se sterlizează într-un borcan de sticlă 30 de minute la autoclav deschis, apoi se injectează călduț intraperitoneal 1,5 ml la 100 g corp-animal, la cobai sau șobolan. La iepure trebuie folosită o soluție 10% cloral hidrat și se injectează intraperitoneal 1,5 ml/kilocorp. Anestezia se instalează în aproximativ 15 minute, este completă și durează cel puțin 1 oră.

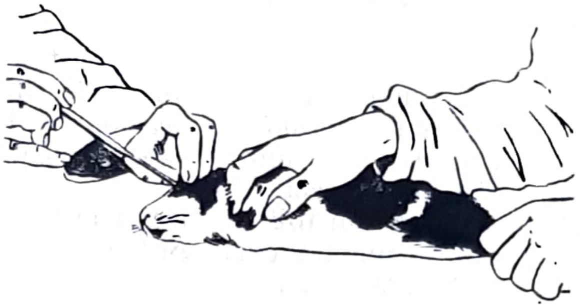


Fig. 278. — Contenția manuală a cobaiului pentru instilația în sacul conjunctival.

Uretanul se folosește în soluție de 25% în doze de 1 g/kilocorp la șobolan și 1,5 g/kilocorp la cobai și iepure.

Animalului anesteziat și operat trebuie să i se acorde îngrijiri speciale. Trezit din narcoză, trebuie menținut timp de cîteva ore la cald în laborator și abia apoi poate fi așezat în cușcă. Procedînd altfel riscăm să favorizăm răceli și infecții ale arborelui respirator.

Tehnica inoculării animalelor de laborator

După natura produsului de inoculat suspensii microbiene, toxine, produse patologice, se pot folosi diferite căi de inoculare, după cum urmează.

a) *Calea cutanată* se poate folosi prin inoculare epidermică și prin injectare intradermică. Cea dintîi constă în depunerea produsului pe stratul cornos al pielii, epilate în prealabil cu un amestec de monosulfură de sodiu 30 g în apă distilată 70 g. Cea intradermică se face prin introducere în grosimea dermului, cu ajutorul unui ac special, introdus aproape paralel cu suprafața pielii, a unei cantități de 0,1—0,3 ml din produsul de inoculat. Injectarea corectă, strict intradermică, determină apariția unei papule caracteristice.

b) *Calea subcutanată* se folosește după prealabila smulgere a părului și dezinfectare locală cu alcool iodat. Acul se introduce în țesutul celular subcutanat, injectîndu-se o cantitate de produs variabilă cu specia animalului. Dozele maxime sînt 30 ml la iepure, 15 ml la cobai, 1 ml la șoarece și 5—8 ml la șobolan. Injecțiile se practică la nivelul spatelui, coapsei sau flancului la cobai, la nivelul abdomenului sau spatelui la iepure, şoarece şi şobolan.

c) *Calea intravenoasă* se foloseşte în funcţie de specia animală, la nivelul unde venele sînt mai accesibile.

La iepure se foloseşte vena auriculară marginală externă, a urechii; se smulge părul, se antiseptizează cu alcool iodat, se comprimă baza urechii şi se puncţionează vena, introducîndu-se maximum 10—15 ml lichid. La cobai, această cale este mult mai dificilă; se foloseşte vena safenă, la nivelul feţei dorsale şi interne a coapsei, şi se injectează maximum 5—6 ml lichid. Se mai poate folosi şi jugulara externă, după prealabilă descoperire prin incizarea pielii şi aponevrozei cervicale superioare.

La şoarece şi şobolan se folosesc venele caudale, după provocarea prealabilă a unei vasodilataţii prin menţinerea cozii în apă caldă timp de cîteva minute. Cantitatea maximă care poate fi inoculată este de 0,5 ml.

d) *Calea intraperitoneală* se poate folosi în egală măsură la toate animalele de laborator, injecţia făcîndu-se în regiunea subombilicală; cantitatea maximă de lichid care se poate astfel introduce este de 50 ml la iepure, 20 ml la cobai, 2 ml la şoarece şi 10 ml la şobolan.

e) *Calea intracerebrală* este folosită, în funcţie de specia animală, astfel: la iepure şi cobai se face după trepanarea prealabilă a cutiei craniene; prin orificiul creat, se introduce intracerebral o cantitate maximă de lichid de 0,5 ml la iepure şi 0,2 ml la cobai.

La şoarece şi şobolan, injectarea intracerebrală se face cu ajutorul unei seringi speciale gradate în subdiviziuni, prevăzută cu un ac special foarte fin; cantitatea de lichid care poate fi introdusă este de 0,1—0,2 ml.

f) *Căile aeriene* folosesc diferite procedee: inhalarea, instilarea intranazală, injecţia intratraheală directă sau după denudare prealabilă:

— inhalarea se practică după introducerea animalului într-un recipient închis, în interiorul căruia se pulverizează produsul de inspirat (aerosoli microbieni etc.);

— instilarea intranazală se face după prealabila anesteziere uşoară a animalului; acesta este ţinut în poziţie verticală, introducîndu-i-se, cu pipeta sau cu seringa, cîte 2—3 picături de lichid în fiecare nară;

— injectarea intratraheală directă se practică prin introducerea acului în trahee sub cartilajul laringian şi injectarea unei cantităţi de maximum 8 ml la iepure, şi de 2—3 ml la cobai; cea indirectă se face după denudarea traheei, şi puncţionarea ei între două inele cartilaginoase.

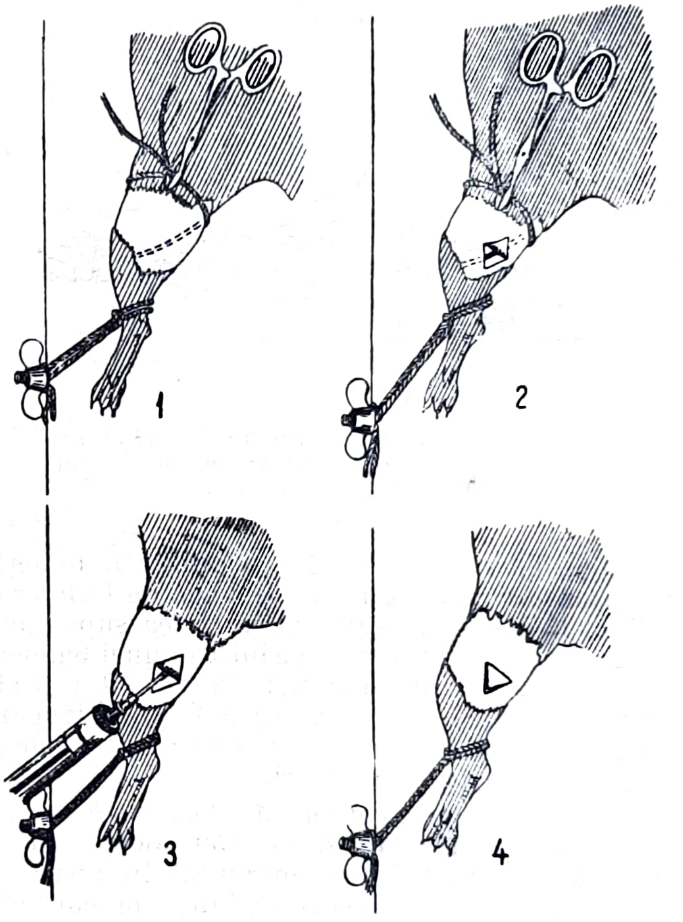


Fig. 279. — Tehnica descoperirii şi injecţiei în vena safenă a cobaiului.
1—4: Timpii operaţiunii

g) *Căile digestive* se folosesc, fie prin introducerea în tubul digestiv de alimente contaminate în prealabil, fie cu ajutorul unei sonde stomacale. La iepure şi cobai se foloseşte, de regulă, o sondă ureterală fără pavilion, care este introdusă în stomacul animalului şi apoi, cu ajutorul unei seringi adaptate la capătul opus, se inoculează prin sondă produsul de injectat. La şoarece, în locul sondei, se foloseşte o seringă, la care s-a adaptat un ac cu vîrful tăiat şi tocit.

Prelevările de sînge şi sîngerarea la animalele de laborator

Pentru a obţine o cantitate mică de sînge, la cobai se secţionează cu o foarfecă urechea, la şoarece se taie vîrful cozii şi la iepure se puncţionează vena marginală.

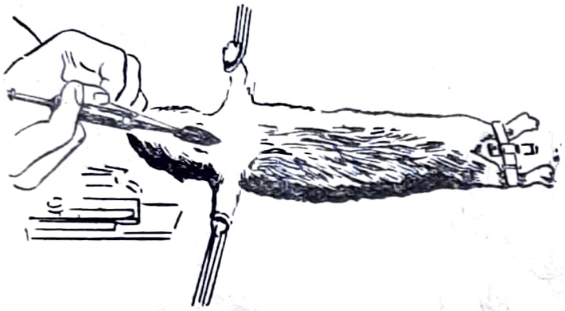


Fig. 280. — Contenţia cobaiului anesteziat în aparatul tip Latapie pentru prelevarea sîngelui prin puncţie arterială.

Dacă dorim să recoltăm steril prin puncţia venoasă o cantitate mică de sînge de la iepure, efilăm la becul de gaz extremitatea superioară a unui tub de hemoliză cu ajutorul unei baghete de sticlă şi realizăm astfel un vîrf din sticlă asemănător acului de puncţie. Se puncţionează vena marginală a urechii cu acest ac de sticlă şi sîngele curge în tubul steril.

Puncţia cardiacă la cobai. Se alege un cobai viguros, de 450—500 g şi se fixează pe spate întins orizontal în aparatul de contenţie. Se epilează regiunea precordială şi se antiseptizează cu tinctură de iod. Se alege un ac de 5 cm lungime, cu tăietura scurtă, şi 1 mm diametru. Teoretic, locul de elecţie pentru puncţie este situat pe marginea stîngă a sternului, la aproximativ 1 cm deasupra unghiului format de apendicele xifoid şi ultimul cartilaj costal articulat cu sternul. În practică este mai bine să badijonăm cu iod şi alcool indexul mîinii stîngi şi să puncţionăm la locul unde simţim mai puternic şocul precordial. Acul se introduce perpendicular, la circa 1,5 cm adîncime, fie ca atare, dacă sîngele recoltat nu trebuie să fie steril, fie montat pe o seringă Luer de 10 ml, dacă este necesar, sînge recoltat steril.

În mod obişnuit se pot recolta 8—10 ml de sînge de la un cobai viguros, fără nici un fel de risc pentru animal, iar priza de sînge poate fi repetată după o săptămînă.

Puncţia cardiacă la iepure. Datorită faptului că iepurele este fixat pe spate în poziţie orizontală, şocul precordial se simte mai puţin net ca la cobai. Este indicat să puncţionăm în al treilea spaţiu intercostal stîng la 3 mm în afara marginii stîngi a sternului. Uneori însă este preferabil ca un ajutor să menţină iepurele imobilizat în poziţie verticală, prezentînd operatorului regiunea precordială, pentru ca puncţia să reuşească mai uşor. Un iepure adult sănătos poate furniza, fără inconveniente, pînă la 20 ml sînge într-o priză.

Puncţia arterială la iepure. Animalul este fixat pe spate în aparatul de contenţie, cu ceafa sprijinită pe o pernă mică. Se epilează cu grijă regiunea gîtului, se rade şi se dezinfectează pielea cu tinctură de iod. Incizia pielii se face pe linie mediană pînă la aponevroza cervicală superficială. Se secţionează apoi cu grijă şi aponevroza, pentru a nu leza vena jugulară superficială. Se disecă în continuare cu sonda canelată muşchiul pielos al gîtului şi marginea internă a muşchiului sterno-cleido-mastoidian, care se deplasează în afară cu ajutorul unui depărtător. Se descoperă apoi pachetul vasculo-nervos al gîtului, care este în raport ventral cu muşchii paravertebrali şi intern cu marginea esofagului şi traheei.

Pachetul vasculo-nervos este format, dinăuntru în afară, de carotidă, nervul pneumogastric şi vena jugulară. Se desprinde artera de pachet cu ajutorul sondei, pe o porţiune de 5 cm, şi se încarcă pe sondă. Se trec pe dedesubtul arterei 3 fire de legătură : cu un fir se aplică o

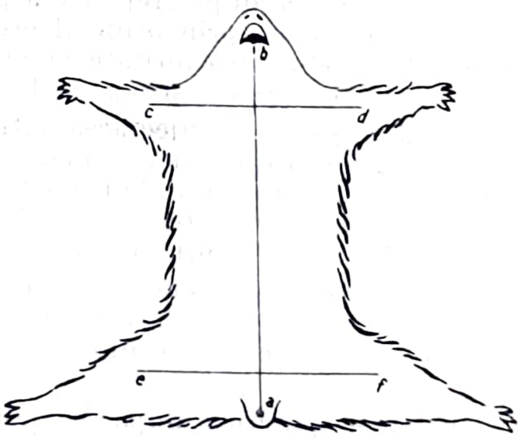


Fig. 281. — Autopsia animalelor de experienţă. Inciziile pentru disecţia pielii şi a ţesutului celular subcutanat.

legătură la nivelul extremității cefalice, celălalt fir se plasează pentru legătura finală la extremitatea cardiacă a arterei. Artera, devenită turgescentă prin legătura cefalică, este pensată cu o pensă hemostatică la nivelul extremității cardiace. Se insinuează indexul mîinii stîngi sub arteră și cu o foarfecă fină se face o butonieră în peretele vasului, în așa fel încît să putem introduce o canulă cu olivă și mandren. Se aplică o ligatură deasupra olivei și se desface pensa hemostatică. Dacă scoatem mandrenul canulei, sîngele curge liber în vasul de prelevare.

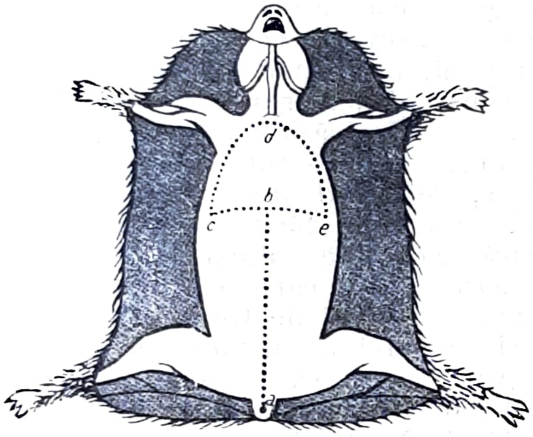


Fig. 282. — Autopsia animalelor de experiență. Inciziile pentru deschiderea cavității abdominale și toracice.

Iepurele poate fi sîngerat total sau parțial. În cazul că facem numai o sîngerare parțială, de 30—40 ml, atunci, după prelevarea cantității necesare de sînge, aplicăm o a treia ligatură pe locul unde am efectuat hemostaza cu ajutorul pensei hemostatice. Apoi se scoate canula, se refac straturile și se sutureazǎ pielea. În scurt timp se realizează o circulație colaterală și animalul nu are de suferit. După aproximativ 3—4 săptămîni se poate face o altă sîngerare arterială la artera din partea opusă.

Autopsia animalelor de experiență

O autopsie corectă trebuie executată imediat după moartea animalului, spre a se evita invadarea germenilor din cavitățile naturale (*Esch. coli*, *Cl. septicum*, *Proteus* etc.), în circulația generală. Autopsia se practică pe tăvi metalice speciale, cu marginile ridicate și perforate, spre a permite fixarea cadavrului.

Iepurele și cobaiul se autopsiază după fixarea cadavrului pe tavă, urmată de incizarea feței ventrale de-a lungul unei linii verticale submentopubiene și a 2 linii orizontale între cele 2 perechi de membre. Se disecă pielea și țesutul celular subcutanat. Apoi se deschide cavitatea abdominală, ridicîndu-se întîi mușchii abdominali; printr-o mică butonieră practicată pe linia mediană, se incizează stratul muscular de la pubis la apendicele xifoid, evidențiind conținutul cavității abdominale. Se notează aspectul și conținutul acestora, epanșamente seroase, purulente, hemoragice. Se prelevează fragmente din diferitele viscere în recipiente sterile, în vederea examenului bacteriologic și anatomopatologic. Se pune în evidență cavitatea toracică, prin secționarea coastelor cît mai aproape de inserțiile lor vertebrale, urmată de ridicarea și răsfrîngerea plastronului costal. Se notează aspectul și conținutul cavității toracice și se fac prelevările necesare de organe.

Pentru efectuarea hemoculturii din cadavrul proaspăt autopsiat, se fixează vîrful cordului cu o pensă, se cauterizează suprafața ventriculului drept cu o spatulă fierbinte și se puncționează ventriculul cu o pipetă Pasteur sterilă, în care se aspiră o mică cantitate de sînge, care este imediat însămînțat pe mediile de cultură adecvate.

Șoarecele și șobolanul se autopsiază printr-o tehnică asemănătoare, după prealabila fixare a cadavrului pe o placă de plută sau de azbest.

După autopsie cadavrul este împachetat cu grijă și distrus prin ardere într-un cuptor crematoriu, iar tava de autopsie este dezinfectată prin flambare cu alcool, urmată de o spălare cu apă de Javel sau cloramină 1%. În lipsă de crematoriu, cadavrul se așază într-o groapă adîncă, de 0,80—1 m și se acoperă cu pămînt, după ce s-a turnat peste cadavru var nestins.

Diagnosticul bacteriologic al unei infecții cu evoluție acută sau cronică prin provocarea bolii experimentale la animalul sensibil

Cunoașterea metodelor de lucru cu diferitele animale de laborator permite folosirea acestora pentru izolarea și în unele cazuri, identificarea unui agent patogen, prin conferirea bolii experimentale ca urmare a inoculării produsului patologic suspect.

În acest scop, produsele patologice lichide sau fluide, ca de pildă lichidul cefalorahidian, urinile prelevate steril, lichidele pleurale puncționate aseptic etc. se inoculează ca atare sau după prealabilă centrifugare se inoculează depozitul obținut. Fragmentele de organe sînt mai întîi tăiate în porțiuni foarte mici, cu foarfeca, apoi triturate într-un mojar steril, după adăugare de nisip de cuarț steril, diluate cu un volum adecvat de ser fiziologic steril, suspensia finală fiind trecută prin pîlnie cu tifon steril. Căile de inoculare cele mai obișnuite sînt : cea subcutanată pentru urină, spută omogenizată, fragmente de organe etc. și cea intraperitoneală pentru lichid cefalorahidian, urină recoltată steril și excepțional, alte produse, care fiind mai greu de debarasat de flora asociată, ar provoca o peritonită nespecifică. Aceste căi sînt frecvent folosite la cobai, și cu mult mai rar la celelalte animale.

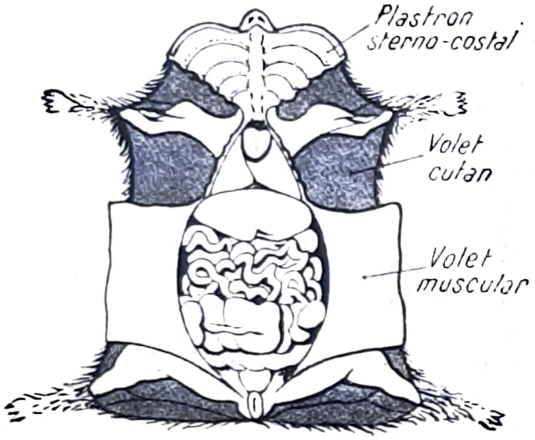


Fig. 283. — Autopsia animalelor de experiență. Evidențierea organelor din cavitatea toracică și abdominală.

Infecțiile în care inocularea la animal a unui produs biologic în vederea diagnosticului constituie proba de certitudine pentru precizarea naturii infecției sînt în special : infecțiile pneumococice cu *Klebsiella*, cu *B. anthracis* etc. dintre infecțiile cu caracter acut, și tuberculoza cu diferitele ei localizări, pentru cele cu evoluție cronică.

Infecția pneumococică, infecția cu evoluție acută tipică, poate fi diagnosticată bacteriologic, cel mai bine, prin inocularea produsului patologic (sputa) la animalul de elecție, care este în acest caz șoarecele. Sensibilitatea acestui animal față de pneumococ este atît de mare, încît el poate fi omorît cu o doză de : 1 :1 000 000/ml cultură vie. Izolarea pneumococului prin provocarea bolii experimentale după injectarea produsului este o metodă mai precisă și mult mai sensibilă decît izolarea pe orice mediu de cultură.

În practică, se procedează astfel : sputa proaspăt emisă de bolnav, într-un recipient steril, placă Petri, este suspendată în cîțiva ml ser fiziologic steril, agitînd amestecul pînă cînd se omogenizează perfect. Din această suspensie omogenă se injectează la 2 șoareci, pe cale subcutanată, în regiunea bazei cozii, cîte 0,5 ml suspensie. Injectarea intraperitoneală comportă riscul provocării unei peritonite nespecifice și deci pierderea animalelor. De la locul de inoculare, germenul trece rapid în circulația generală, animalul făcînd o septicemie pneumococică, care duce după 24—48 de ore, la moarte. În cazul în care moartea nu a survenit după acest interval de timp, el trebuie sacrificat și i se prelevă în mod aseptic sînge din inimă prin puncție cardiacă, care este imediat trecut la un alt șoarece și pe medii de cultură adecvate. Dacă animalul a murit trebuie imediat autopsiat. Este necesar să nu se întîrzie autopsia și adeseori cînd observăm că animalul este deja în comă, este preferabil să-l omorîm cu un tampon de eter și să-l autopsiem imediat. Chiar dacă se menține cadavrul animalului la frigider la +4°, flora de autoliză cadaverică invadează după cîteva ore țesuturile și organele, și ne falsifică rezultatele.

Infecția tuberculoasă, tip de infecție cu evoluție cronică, provocată de bacilul tuberculozei virulent, de tip uman sau bovin, necesită adesea, pentru a fi diagnosticată cu preciziune, inocularea produsului patologic (spută, urină, lichid cefalorahidian, fecale, revărsate seroase etc.) la animalul sensibil.

Această metodă este pe drept cuvînt socotită ca cea mai sensibilă dintre toate metodele cunoscute pentru diagnosticul bacteriologic al infecției bacilare, dată fiind marea receptivitate a cobaiului față de bacilul tuberculozei virulent.

Calea de elecție pentru inocularea produsului este cea subcutanată, mai rar cea intraperitoneală sau cea intraganglionară. Produsul de inoculat va fi în prealabil tratat după metodele adecvate spre a fi debarasat de flora de asociație pe care o cuprind, de cele mai multe ori aceste produse și mai ales sputa. Actualmente se recomandă ca produsul suprainfectat să fie injectat o dată cu un antibiotic cu spectru larg, ca aureomicina, după amestecarea lor prealabilă.

Inocularea se practică, de regulă, la nivelul feței ventrale a coapsei unuia dintre membrele posterioare drept sau stîng, epilat și dezinfectat în prealabil cu tinctură de iod. Cu ajutorul unei seringi sterilizate de 2 ml, se injectează 1 — 2 ml din suspensia de cercetat. După injecție, locul de inoculare este din nou dezinfectat cu tinctură de iod.

În cazul în care produsul conține numeroși bacili tuberculoși, se observă cum după prima săptămînă de la inoculare regiunea învecinată cu locul de inoculare se infiltrează, formînd un nodul, iar la nivelul plicii inghinale începe să se simtă, la palpare, un mic ganglion dur și mobil. Nodulul de la locul de inoculare crește, se ramolește și în cele din urmă abcedează, transformîndu-se într-o ulcerație; este șancrul de inoculare, care persistă pînă la moartea animalului. Tot cam în această perioadă se instalează și starea de alergie; animalul devine sensibil la tuberculină și răspunde printr-o reacție caracteristică, la început infiltrativă, eritematoasă și apoi papulo-necrotică la injectarea, pe cale intradermică, de tuberculină. Aceasta se practică cu ajutorul unei seringi speciale de 1 ml, injectîndu-se pe pielea epilată a animalului 0,1 ml dintr-o diluție 1 : 10 sau 1 : 20 de tuberculină în ser fiziologic. Pozitivarea acestei reacții constituie unul din semnele precoce cele mai importante că animalul a devenit infectat cu bacili tuberculoși. Rezultatul ei se citește, la 24 și 48 de ore de la injectare.

Spre săptămîna a treia de boală cobaiul slăbește progresiv, devine apatic, părul începe să-și piardă luciul și să se zbîrlească. Dacă toate aceste semne de boală sînt prezente, animalul este lăsat să supraviețuiască 4 —6 săptămîni, după care este sacrificat. La autopsie se observă, pe lîngă hipertrofierea masivă și cazeificarea ganglionilor inghinali, splina mult mărită de volum, friabilă, cu aspect congestiv-hemoragic și prezentînd pe suprafața ei numeroase granulații, tuberculi sau chiar plaje de cazeificare. De asemenea, ficatul este și el hipertrofiat, congestionat, cu semne de degenerescență grasă și cu numeroase granulații, noduli sau zone de cazeificare, diseminate pe suprafață. Plămînul se prinde mai tîrziu, celelalte organe rămînînd, de regulă, neafectate.

În cazul în care animalul a prezentat leziuni macroscopice caracteristice, din organele lezate se fac frotiuri, care se colorează după metoda Ziehl-Neelsen, punîndu-se astfel în evidență prezența de bacili acido-alcoolorezistenți. Din fragmentele de organe, prelevate în mod aseptic și triturate cu ser fiziologic în mojar steril și apoi trecute prin pîlnie cu tifon, se pot face însămînțări pe mediile selective pentru izolarea bacililor tuberculoși în cultură pură. Mediul cel mai de recomandat în acest scop este mediul Loewenstein-Jensen. Cu microbul izolat în cultură pură, se precizează tipul uman sau bovin de bacil tuberculos și se efectuează antibiograma. Dacă produsul injectat a fost prea sărac în bacili (paucibacilar), infecția experimentală poate avea o evoluție mult mai îndelungată în timp, depășind uneori 6 luni; în aceste cazuri, la autopsie, leziunile din organe sînt mai discrete și precizarea naturii lor tuberculoase necesită adesea un examen suplimentar histopatologic, pentru decelarea foliculilor tuberculoși în organe, precum și o reinoculare a unui fragment de organ la alți cobai.

BIBLIOGRAFIE

ANDREESCU VIORICA — Bacteriologie medicală, (sub redacția prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, București, 1961, p. 182—205.

BIRGHER G. O. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecțioase, G. I. Sinai și O. G. Birgher, Ed. științifică, București, 1952.

CALMETTE A. — L'infection bacilaire et la tuberculose, Ediția a 4-a, Ed. Masson, Paris, 1936.

HALMANN L. — Bakteriologie und Serologie, Ediția a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 718—724.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approved Laboratory Techniques, Ed. Appleton-Century, New-York, 1945, p. 12—34.

MACKIE J. T., MC CARTNEY E. J. — Handbook of Practical Bacteriology, Ediția a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 202—230.

PARAF J. — La tuberculose du cobaye, Ed. Masson, Paris, 1939.

DETERMINAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE ȘI CHIMIOTERAPICE A MICROBILOR PATOGENI AEROBI (ANTIBIOGRAMA)

Antibiograma ne dă indicații prețioase asupra sensibilității *in vitro* față de antibiotice și chimioterapice a unei tulpini microbiene izolate dintr-un produs patologic.

Mecanismul antibiogramei constă în inhibarea creșterii unei culturi microbiene puse în contact cu doze variate de antibiotice și chimioterapice într-un mediu de cultură adecvat.

Antibiograma are avantajul că ne indică, pe de o parte antibioticul cel mai activ față de microbul testat, iar pe de altă parte ne permite o asociere judicioasă a mai multor chimioterapice sau antibiotice cu acțiunea cea mai selectivă și ne dă indicații asupra dozelor care trebuie administrate.

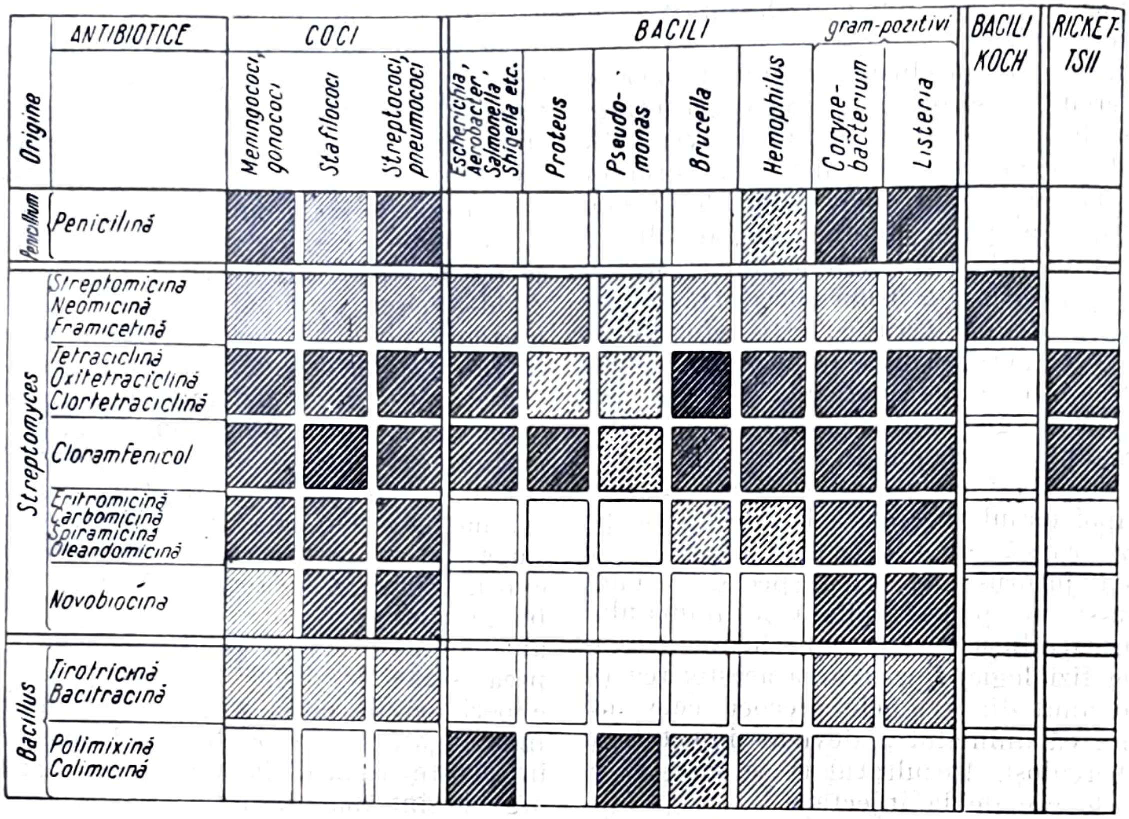


Fig. 284. — Spectrul de activitate antibacteriană a antibioticelor uzuale față de principalele specii microbiene patogene pentru om (Desimea hașurilor indică gradul de activitate antibacteriană) (După Chabbert, 1958).

Prin determinarea concentrațiilor de antibiotice și chimioterapice în sînge și umori se pot aprecia corespondența care se stabilește între sensibilitatea *in vitro* și eficacitatea *in vivo* a chimioterapicului sau antibioticului folosit.

Numai în aceste condiții se poate institui și conduce un tratament antiinfecțios pe baze științifice.

Folosirea, în terapeutica antiinfecțioasă, a unui număr mereu crescînd de antibiotice în condiții judicioase și în doze subbacteriostatice a determinat apariția fenomenului de rezistență la antibiotice și chimioterapice. Faptul că rezistența cîștigată la antibiotice este un atribut de tulpină și nu de specie, cu alte cuvinte, în cadrul aceleiași specii, se întîlnesc tulpini sensibile și rezistente față de același antibiotic, face obligatorie determinarea sensibilității la antibiotice și chimioterapice a microbului izolat înaintea administrării tratamentului antiinfecțios.

Dezavantajele antibiogramei constau în faptul că necesită 18 — 24 de ore interval pentru aprecierea rezultatelor testării și în aceea că rezultatele sensibilității *in vitro* nu se suprapun întru totul cu cele ale sensibilității *in vivo*. De aceea indicațiile antibiogramei trebuie considerate de ordin calitativ; ele ne arată orientativ gradul de sensibilitate *in vitro* a unei tulpini fapt care ne servește la stabilirea dozelor terapeutice.

Tendințele recente de a obține o scurtare a intervalului de timp în care se obțin indicațiile antibiogramei, prin așa-numitele metode rapide, pe flora totală a produsului patologic, trebuie combătute, pentru că măresc mult posibilitățile de aprecieri eronate și contribuie la discreditarea unei metode a cărei valoare este bine stabilită.

Este preferabil ca antibiograma să fie efectuată întotdeauna cu tulpina microbiană izolată din produsul patologic în cultură pură și identificată ca patogenă.

Două grupuri de metode se folosesc astăzi pentru realizarea antibiogramei. Metodele care se bazează pe efectuarea diluțiilor de antibiotice în medii lichide și metodele difuzimetrice pe medii solide. Metodele diluțiilor în medii lichide se folosesc mai rar, numai în cazul infecțiilor de lungă durată, ca endocardita bacteriană subacută, în care se administrează doze mari de antibiotice timp îndelungat. În aceste cazuri este necesară, pe lîngă testarea sensibilității față de antibiotice și o determinare a concentrațiilor minime de antibiotice pentru inhibarea creșterii agentului patogen.

În această situație, cercetarea sensibilității unei tulpini de *Streptococcus viridans* sau enterococ este mai utilă prin această metodă, decît printr-o metodă difuzimetrică, care dă indicații mai relative.

METODA DILUŢIILOR ÎN MEDII LICHIDE

În diluții crescînde de antibiotic se însămînțează o cantitate fixă din cultura de cercetat, stabilindu-se diluția de antibiotic în prezența căreia tulpina de cercetat este inhibată.

Diluțiile de antibiotice se vor face direct în mediul lichid nutritiv și deoarece antibioticele dizolvate se inactivează foarte ușor cînd sînt în diluții mari, se recomandă păstrarea lor în soluții mai concentrate, la ghețar, diluîndu-se în mediu numai în momentul folosirii. Chiar soluțiile concentrate este bine să le folosim un timp limitat: 3 — 4 zile pentru penicilină și 7 — 10 zile pentru celelalte antibiotice.

Mediile de cultură folosite vor fi: pentru antibiotice, apă peptonată 2%, glucozată 1%, cu pH 7,4 — 7,6, pentru sulfamide și aureomicină, bulion glucozat 1% (fără peptonă) cu pH 7,4 — 7,6, căruia i se adaugă, în momentul folosirii, lichide organice (ser, ascită, sînge).

Acest mediu cu adaos de lichide organice va fi întrebuințat și pentru testarea sensibilității la antibiotice, în cazul microbilor mai exigenți, ca brucele, pneumococi, streptococi etc.

Concentrațiile maxime de antibiotice de la care se pleacă pentru efectuarea diluțiilor vor fi: pentru penicilină 100 u./ml, pentru streptomicină 100 γ/ml, cloramfenicol 10 γ/ml, tetraciclină 10 γ/ml, nitrofuran 10 γ/ml, sulfatiazol 20 — 100 mg/ml.

Cultura bacteriană de testat se prepară astfel: dintr-o cultură în bulion de 18 — 20 de ore se ia o picătură și se diluează cu 10 ml ser fiziologic steril. O picătură din această diluție se amestecă cu încă un ml ser fiziologic. Această ultimă diluție servește la însămînțarea tuburilor.

Tehnica de lucru. În cele de mai jos dăm ca exemplu schema pentru cercetarea acțiunii streptomicinei. Schema este valabilă pentru toate antibioticele, cu deosebirea că diluțiile inițiale vor fi altele pentru fiecare antibiotic în parte.

Se utilizează 12 tuburi pentru fiecare dintre antibioticele de cercetat. Se pune în fiecare tub în afară de primul, cîte 0,5 ml mediu. Se adaugă apoi cîte 0,5 ml mediu conținînd 100 γ streptomicină pe milimetru, în primul și al doilea tub. Din amestecul din al doilea tub se trece 0,5 în tubul nr. 3, apoi din tubul nr. 3 în tubul nr. 4, și așa mai departe în fiecare tub, pînă la tubul martor. Din ultimul tub se va îndepărta 0,5 ml.

Se însămînțează tuburile cu cîte o picătură din diluția de cultură de testat.

În tubul martor se face controlul capacității de creștere a tulpinii pe mediul folosit (0,5 ml mediu nutritiv, plus o picătură din cultura de testat).

TABELUL 105

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	M
Mediu nutritiv (ml)	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Soluție streptomicină 100 γ/ml (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Diluție din cultura de testat	o picătură în fiecare tub											
Diluțiile finale de streptomicină în γ/ml	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	—

Se recomandă și utilizarea unui martor pentru antibiotic, folosindu-se pentru aceasta o tulpină standard, a cărei sensibilitate la antibiotic este cunoscută, ca de pildă stafilococul Oxford pentru penicilină. Citirea rezultatelor se face după 18 — 20 de ore la 37°. Intensitatea turbidității mediului indică gradul de insensibilitate sau rezistență a microbului la antibioticul sau chimioterapicul utilizat.

Ultimul tub limpede indică cea mai mare diluție de antibiotic sau concentrația minimă de antibiotic necesară, *in vitro*, pentru inhibarea tulpinii testate.

Metoda prezintă avantajul că poate da indicații, atît asupra sensibilității tulpinii testate, cît și asupra concentrației minime de antibiotic necesară, *in vitro*, pentru inhibarea ei.

Metoda rapidă în medii lichide

Rogers a adaptat testul de culoare cu roșu de fenol la metoda de testare a sensibilității în medii lichide și a obținut o reducere cu 1/3 a intervalului de timp necesar testării.

Mediul lichid folosit este bulionul glucozat 1%, la care se adaugă o soluție apoasă 1‰ de roșu fenol, pînă se obține o culoare roșie netă. Mediul astfel colorat se distribuie în cantitate de 2 ml în tuburi de hemoliză și se sterilizează la autoclav 15 minute la 115°.

În fiecare tub se adaugă 0,1 ml dintr-o serie de diluții de antibiotic. Seriile de diluții se folosesc între 200 și 1 000 γ pentru toate antibioticele, cu excepția penicilinei, care se utilizează în cantități de 5 — 10 ori mai mici.

Cultura bacteriană de testat se prepară după indicațiile menționate la metoda clasică a diluțiilor în medii lichide și se adaugă cîte 1 picătură în fiecare tub. Ca martor al creșterii bacteriene se folosește un tub cu mediu fără antibiotic.

Seriile de tuburi astfel pregătite pentru testare se așază la o baie de apă la 37°. După 3 ore se face prima citire de control la tubul martor; dacă culoarea mediului a virat în galben, aceasta denotă o bună creștere bacteriană, cu metabolizarea glucozei și producere de acid, care determină virajul de culoare spre galben a indicatorului de pH, roșul de fenol (galben în mediu acid, roșu în mediu neutru).

Dacă culoarea martorului a virat în galben se citesc toate tuburile; dacă virajul de culoare nu a apărut se face un nou control, după încă 3 ore. De obicei la 6 ore martorul are virajul net spre galben. În tuburile unde antibioticul a avut efect bacteriostatic nu există dezvoltare microbiană și culoarea mediului rămîne roșie.

METODELE DIFUZIMETRICE

Sînt metodele cele mai simple și mai economice de testare, care au avantajul că pot fi utilizate pentru aproape toate substanțele antimicrobiene. Procedeul cel mai precis pentru aprecierea diferențelor mici de sensibilitate se obține prin însămînțarea microbului pe medii solide, cu înglobare de cantități descrescînde din substanță antimicrobiană. În felul acesta se poate aprecia, prin comparație cu o tulpină martor standard, o inhibare totală sau numai parțială. Acest procedeu are avantajul că dă indicații cantitative, dar este destul de laborios.

Metoda difuzimetrică cantitativă

Se efectuează în apă distilată sterilă 6 diluții descrescînde de penicilină cristalină de la 0,5 pînă la 0,015 unități/ml, în așa fel ca la începutul seriei de diluții să fie prinsă și concentrația standard de 0,03 unități/ml, care se realizează în umorile organismului după administrarea dozelor obișnuite de penicilină. Seria de 6 diluții cele mai recomandabile de folosit este: 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03; 0,015 unități/ml.

Din fiecare diluție se repartizează cîte 1 ml într-o placă Petri. În fiecare din cele 6 cutii Petri se toarnă 10 ml de mediu geloză-sînge la 45-48° și se amestecă, prin mișcări de rotație, în ambele sensuri, cu diluția de penicilină, apoi se lasă pe masa de lucru 10-15 minute, pentru solidificarea mediului.

Fiecare din cele 6 plăci este însămînțată cu ansa într-o jumătate a plăcii cu o cultură de 18-20 de ore în bulion din tulpina standard de stafilococ Oxford (tulpina standard internațională pentru etalonarea acțiunii penicilinei), iar în jumătatea cealaltă a plăcii, cu cultura de 18-20 de ore în bulion a tulpinii de cercetat.

Se poate folosi ca martor, al calității mediului de creștere, o placă de geloză-sînge, fără penicilină, pe care se însămînțează în aceleași condiții cele 2 tulpini.

Plăcile se așază apoi la termostat de 37°, cu suprafața mediului în jos, pentru a evita ca eventualele picături de apă de condensare ce se depun pe capacul cutiei Petri să cadă pe suprafața însămînțată a mediului de cultură și să ducă la confluarea celor două tulpini. Citirea se face după 18 ore de termostatare și sensibilitatea limită a tulpinii este apreciată

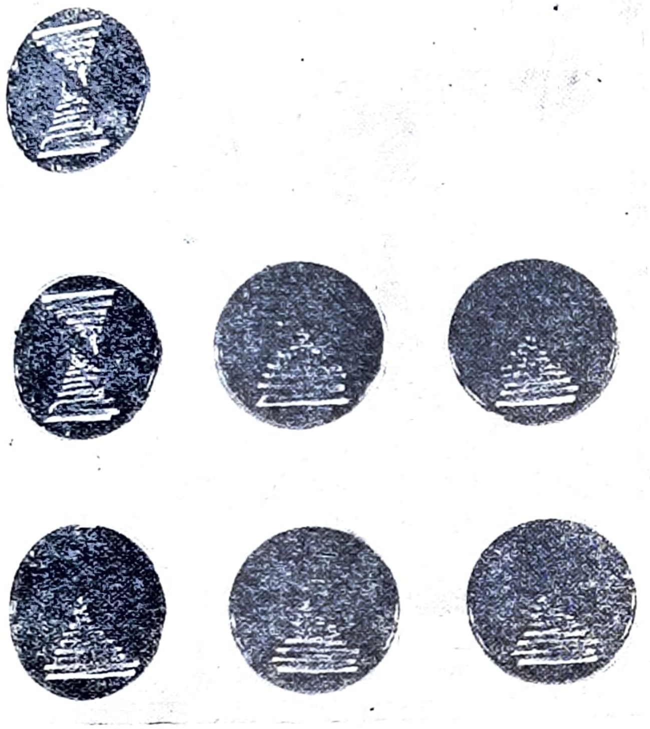


Fig. 285. — Metoda difuzimetrică cantitativă.

după diluția cea mai mare de penicilină capabilă să inhibeze creșterea.

Testarea sensibilității la alte antibiotice se face după aceeași schemă, folosind însă alte concentrații de antibiotice, după cum urmează :

Pentru streptomicină folosim 125 mg sulfat de streptomicină, pe care le dizolvăm în 10 ml tampon fosfat (K_2HPO_4), și realizăm diluții finale de 100, 20, 10, 8, 4, 2, 1, și 0,5 γ/ml.

Pentru eritromicină folosim o soluție mamă cu o concentrație de 1 000 γ/ml în alcool etilic 70% cu tampon fosfat.

Cu 1 ml din această soluție realizăm, în continuare, seria de diluții finale de la 5 la 0,15 γ/ml.

La cicline (aureomicină, teramicină și tetraciclină) se realizează soluții concentrate în tampon fosfat pH 6,3 de 1 000 γ/ml și apoi diluții de la 150 pînă la 0,125 γ/ml și din acestea se repartizează 0,1 ml în fiecare placă, obținîndu-se diluții finale de 1,5 pînă la 0,00125 γ/ml la 10 ml agar.

La cloramfenicol se face o primă serie de soluții cu 500, 250, 125, 62 și 31 γ/ml. Din acestea se repartizează cîte 0,1 ml în plăcile Petri și se obțin concentrații finale de 5 pînă la 0,3 γ la 10 ml agar. Pentru a obține concentrații de 10, 25 și 50 γ/ml se iau din soluția concentrată 0,1 ; 0,25 și 0,5 ml.

Metodele difuzimetrice calitative. Metoda rondelelor.

Cel mai folosit procedeu difuzimetric este folosirea rondelelor din hîrtie de filtru impregnate cu antibiotice.

Se pregătesc rondele cu diametru de 10 mm. Se aleg numai rondelele întregi, se notează pe fiecare cu creionul cantitatea de antibiotic cu care va fi impregnată și se sterilizează într-o cutie Petri la căldură uscată. Se impregnează apoi cu diluțiile de antibiotic, luînd fiecare rondelă în parte cu o pensă sterilă fără dinți, se înmoaie în diluția respectivă, se îndepărtează excesul de lichid prin presare pe peretele tubului și se usucă într-o placă Petri 30 de minute la 37°. Se așază apoi în tuburi închise sau se pot păstra nealterate în exsicator cu Cl_2Ca, timp de luni de zile.

Prepararea diluțiilor de antibiotice. Cu micropipete se socotește cît lichid absoarbe o rondelă de 10 mm diametru. În general, o astfel de rondelă absoarbe aproximativ 0,01 ml. Deci, dintr-un ml soluție se pot impregna circa 80 de rondele. Fiecare rondelă trebuie să fie impregnată cu o anumită cantitate de antibiotic (cea scrisă pe rondelă).

Pentru diferitele antibiotice aceste cantități vor fi :

Aureomicină	5 și 10 γ
Cloramfenicol	10 și 25 γ
Penicilină	0,5 și 2 unități
Streptomicină	10 și 100 γ
Teramicină	5 și 10 γ
Hostaciclină	5 și 10 γ
Eritromicină	0,5 și 5 γ
Oleandomicină	0,5 și 5 γ

Calculul diluțiilor necesare pentru impregnarea rondelelor se face în felul următor :

Dacă o rondelă trebuie să conțină 100 γ antibiotic, pentru 80 de rondele vor fi necesare deci 100 × 80 = 8 000 γ/ml.

Aceasta reprezintă soluția totală de antibiotic necesară pentru a fi impregnate cele 80 de rondele.

Tehnica testării. În plăci Petri cu diametrul de 12 cm se toarnă 20 ml geloză. La plăcile de 10 cm diametru se toarnă 16 ml geloză. Plăcile turnate și răcite se așază apoi cu capacul întredeschis la + 37°, timp de 30 de minute, pentru uscare. Cultura proaspătă de 18—20 de ore în bulion se diluează steril 1% în bulion (0,1 ml + 9,9 ml bulion), și din această diluție se însămînțează placa cu o pipetă Pasteur, se scaldă suprafața și excesul se aspiră cu aceeași pipetă Pasteur, aruncîndu-se în vasul cu amestec oxidant. Se usucă apoi din nou plăcile la + 37°, timp de 10—15 minute, după care, cu ajutorul unei pense fine, care se flambează după fiecare dată, se aplică rondelele pe suprafața agarului, notînd pe placă numărul tulpinii cercetate și data.

Se incubează apoi 18—20 de ore la + 37°. Citirea se face măsurînd cu o riglă gradată diametrul zonei de inhibiție a dezvoltării culturii din jurul rondelei. Cu cît diametrul zonei este mai mare, cu atît tulpina este mai sensibilă la antibioticul respectiv.

Pentru sulfatiazol, dată fiind alcalinitatea sa marcată în soluție și datorită faptului că în mediile uzuale care conțin peptone există factori antisulfamidici, se utilizează mediul Chabbert cu următoarea compoziție :

Macerat de carne	1 000 g
Fosfat disodic	2 g
NaCl	3 g
Glucoză	1 g
Agar-agar	25 g

În momentul folosirii, mediul este topit și răcit la 50° și i se adaugă, în proporție de 10% soluție de hematii hemolizate de cal (1 ml hematii + 4 ml apă distilată).

Metoda pulberilor cu antibiotice

Este tot o metodă difuzimetrică calitativă, al cărei principiu este același ca la metoda precedentă, numai că în locul rondelelor impregnate cu antibiotice se întrebuințează pulberi de antibiotice, fie pulberi ca atare sau tablete mojarate, fie în amestec cu anumite cantități de amidon. Metoda prezintă avantajul că poate fi realizată cu ușurință în orice laborator.

Amidonul care se întrebuințează va fi amidon chimic pur și sterilizat prin încălzire 3 zile consecutiv, 30 de minute, la 60°. Aceste amestecuri de antibiotice cu amidon se păstrează închise etanș, la loc uscat, 5-6 luni, la temperatura camerei. Hidratarea amestecului prin păstrare în condiții de umiditate îl face inutilizabil.

Prepararea pulberilor se face în modul următor :

Penicilina. Conținutul unei fiole de 200 000 u. de penicilină G se amestecă cu 10 g amidon ; 1 g din această pulbere este amestecat cu 9 g amidon. Acesta va fi amestecul de bază de penicilină. La 1 g amestec de bază se adaugă 1 g amidon și se obține pulberea de penicilină de utilizat, care conține 1 000 u. penicilină la 1 g pulbere.

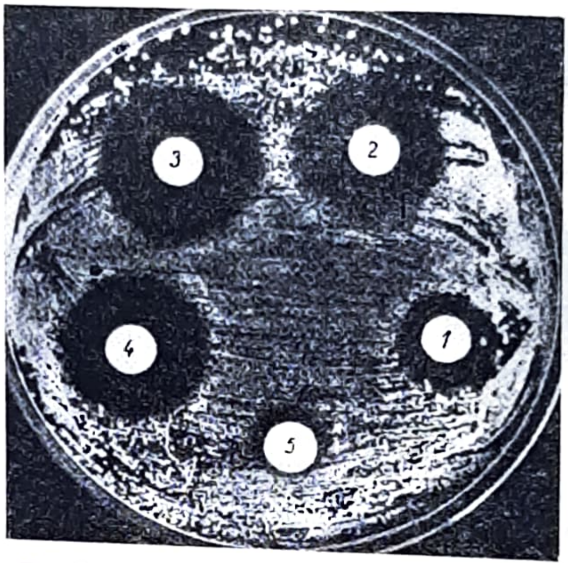


Fig. 286. — Testarea unei tulpini de stafilococ prin metoda rondelelor :
1 — penicilină ; 2 — cloramfenicol ; 3 — teramicină ; 4 — aureomicină ; 5 — streptomicină.

Streptomicina. Se mojarează conținutul unui flacon de 1 g streptomicină cu 9 g amidon. 1 g din acest amestec se mojarează iar cu 9 g amidon, rezultînd amestecul de bază de streptomicină. La 1 g amestec de bază este adăugat 1 g amidon, obținîndu-se pulberea de streptomicină de utilizat, care are o concentrație de streptomicină de 5 mg la 1 g pulbere.

Tetraciclinele (aureomicina, teramicina și hostaciclina). Un cașet sau o tabletă de 250 mg se mojarează cu 5 g amidon, 1 g din această pulbere se mojarează cu 9 g amidon, aceasta fiind pulberea de tetraciclină de utilizat care are o concentrație de 5 mg antibiotic la 1 g pulbere.

Cloramfenicolul. O tabletă de 250 mg este mojarată cu 5 g amidon, 2 g din această pulbere se mojarează apoi cu 8 g amidon și rezultă amestecul de bază de cloramfenicol. La 1 g amestec de bază se adaugă 1 g amidon și va rezulta pulberea de cloramfenicol de utilizat, care are o concentrație de 5 mg cloramfenicol la 1 g pulbere.

Nitrofuranul. Se cîntărește 0,25 g nitrofuran care se mojarează apoi cu 5 g amidon, 1 g din această pulbere este amestecat cu 9 g amidon, obținîndu-se amestecul de bază de nitrofuran. La 1 g amestec de bază se adaugă 1 g amidon și se obține pulberea de nitrofuran de utilizat, care are o concentrație de 2,5 mg nitrofuran la 1 g pulbere.

Eritromicina. O tabletă de 100 mg este mojarată cu 20 g amidon, obținîndu-se pulberea de eritromicină de utilizat cu o concentrație de 5 mg eritromicină la 1 g pulbere.

Sulfatiazolul. Se mojarează 4 tablete de cîte 0,5 g cu 8 g amidon, obținîndu-se amestecul de bază de sulfatiazol. 1 g din această pulbere amestecat cu un 1 g amidon duce la obținerea pulberii de sulfatiazol de utilizat, care are o concentrație de 100 mg sulfatiazol la 1 g pulbere.

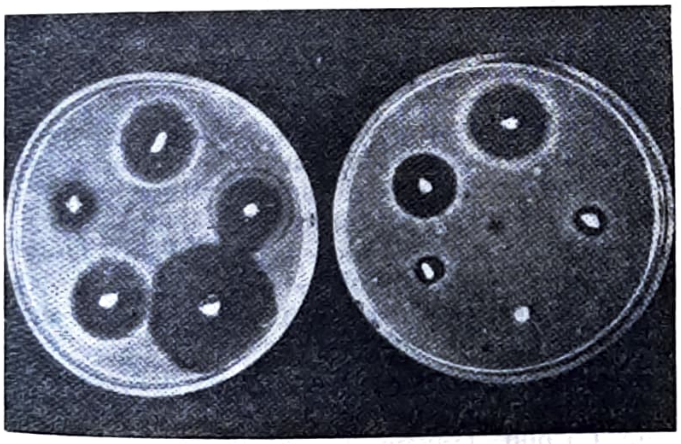


Fig. 286 bis. — Testarea sensibilității la antibiotice a unei tulpini de stafilococ auriu prin metoda pulberilor.

Tehnica antibiogramei cu pulberi de antibiotice este asemănătoare aceleia cu rondele: pe o placă Petri însămînțată cu tulpina de testat, realizată ca la metoda difuzimetrică cu rondele, se vor depune, cu ajutorul unei anse metalice al cărei capăt este ușor lățit în formă de spatulă, cantități mici egale de pulbere cu antibiotice.

Rezultatele se citesc după incubare de 18-20 de ore la + 37°, interpretîndu-se prin măsurarea zonei de inhibare a creșterii bacteriene, ca la orice antibiogramă, prin metoda difuzimetrică.

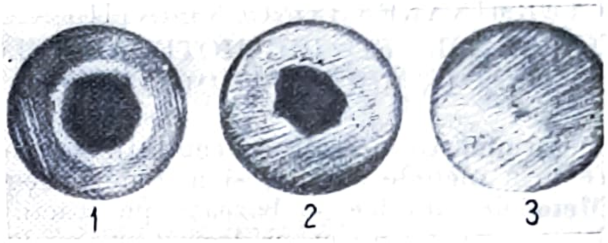


Fig. 287. — Testarea sensibilității la antibiotice după metoda Hermann:

1 — tulpină normal sensibilă; 2 — tulpină moderat sensibilă; 3 — tulpină rezistentă.

Metoda pulberilor simplificată

Simplificarea propusă de Hermann constă în folosirea antibioticelor fără diluare prealabilă. Se folosește amidon de cartof steril, care se încălzește 3 zile consecutiv 30 de minute la 60°.

Pentru penicilină, care are putere mare de difuziune, se adaugă direct în flaconul original de 200 000 u. 5 g de amidon, se amestecă bine și din acest amestec inițial se ia 1 g, care se amestecă din nou cu 9 g amidon steril, într-o sticluță sterilă.

Pentru aureomicină, streptomicină, teramicină și cloramfenicol se amestecă 200 mg cu 1 g de amidon steril.

Aceste amestecuri de amidon cu antibiotic se păstrează închise etanș la loc uscat, timp de cîteva luni, la temperatura camerei.

Tulpina de testat se însămînțează, dintr-o cultură în bulion de 18-20 de ore, pe suprafața unei plăci cu agar-sînge, se aruncă excesul de cultură prin înclinarea plăcii Petri și prin aspirație cu o pipetă Pasteur. Se lasă placa să se usuce 10-15 minute după însămînțare și apoi se depune steril, cu ajutorul unei anse de platină spatulate cu diametrul de 3 mm, o cantitate de amestec de antibiotic cu amidon.

Plăcile astfel pregătite se lasă 1-2 ore pe masa laboratorului, pentru ca antibioticul să poată difuza bine în agar, înainte de dezvoltarea bacteriilor și apoi se introduc la termostat la 37°. După 18-20 de ore apar zonele concentrice de inhibare a creșterii, care la tulpinile sensibile, trebuie să fie de cel puțin 30 mm diametru. La tulpinile moderat sensibile și sensibile la limită, zona se reduce la 20-15 mm diametru. La tulpinile rezistente nu apare inhibarea creșterii.

DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI ANTIBIOTICELOR ȘI CHIMIOTERAPICELOR ÎN SÎNGE ȘI UMORI

Determinarea acestei concentrații se poate face prin metode chimice și metode biologice.

Metodele chimice se bazează pe reacții de culoare și se fac în cazul dozării sulfamidelor, acidului paraaminosalicilic și hidrazidei.

Metodele biologice sînt cele mai sensibile și capabile de a decela concentrații scăzute de antibiotice în sînge și umori.

Principiul metodei constă în punerea în evidență a puterii antimicrobiene a lichidului de cercetat (ser, lichid cefalorahidian, urină etc.) față de tulpina microbiană standard.

În acest scop, este necesar, ca microbul folosit să prezinte o serie de calități:

a) să fie foarte sensibil, adică să fie inhibat în dezvoltarea sa de concentrații cît mai mici de antibiotic;

b) să fie puțin pretențios, adică să fie capabil să crească în ser sau alte umori, cu un adaos minim de mediu de cultură, căci folosirea unor cantități mai mari de mediu de cultură va duce la o diluare prea mare a antibioticului din umorile de cercetat;

c) creșterea sa să fie bine vizibilă, fie sub forma unui grad de turbiditate a mediului, fie prin schimbarea pH, care duce la virarea unui indicator (în cazul folosirii mediilor cu adaos de indicator).

De asemenea, trebuie să se țină seama și de puterea antimicrobiană normală a serului sanguin. Se recomandă ca la serul de cercetat să se adauge soluție sterilă de licoid 0,5% (polianetol sulfonat de sodiu) care oprește coagularea sîngelui și blochează puterea bactericidă a serului sanguin.

În cazul dozării streptomicinei, teramicinei tetraciclinei, cloramfenicolului și a nitrofuranului, serul poate fi inactivat și prin căldură la 56°, fără a fi pericol de inactivare a antibioticului. Acest procedeu nu se va folosi însă în cazul penicilinei. Recoltarea produselor (ser, lichid cefalorahidian, urină etc.), precum și prelucrarea lor se vor face în condiții de sterilitate și se recomandă efectuarea analizei în aceeași zi, în special în cazul dozării antibioticelor mai labile ca: penicilină, aureomicină etc.

Metoda cel mai des folosită este metoda diluțiilor în serie, care constă în aflarea concentrației minime a antibioticelor din sînge, și umori, capabilă să producă inhibarea unui microorganism-test, în comparație cu un etalon din antibioticul de cercetat.

Etalonul de antibiotic are o activitate cunoscută, care este exprimată în unități pentru penicilină sau în μg sau γ pentru celelalte substanțe.

Tulpinile microbiene standard întrebuințate au o sensibilitate cunoscută și constantă.

TABELUL 166

Sensibilitatea unor tulpini standard la diferite substanțe antibiotice

Tulpina standard	Antibiotic	Limita inferioară a sensibilității în u. (penicilină și γ/ml
Stafilococ (tulpina Oxford 12)	Penicilină	0,03 u./ml
	Streptomicină	2–5 γ/ml
	Cloramfenicol	2–3 γ/ml
	Aureomicină	0,4 γ/ml
B. subtilis (tulpina Marburg)	Penicilină	0,03 u./ml
	Streptomicină	9–10 γ/ml
	Cloramfenicol	0,6 γ/ml
	Aureomicină	0,4 γ/ml

Prepararea și păstrarea tulpinii microbiene standard. Se întrebuințează de obicei ca bacterie-test o tulpină de stafilococ auriu Oxford, care se va trece săptămînal pe geloză înclinată, verificîndu-se periodic și gradul de sensibilitate, aspectul morfologic etc. În preziua testării, tulpina se va trece din geloza înclinată pe un tub cu bulion simplu.

În ziua testării din această cultură se va face o diluție în bulion glucozat 5‰ în proporție de 1/1 000. Diluția de cultură se păstrează la frigider pînă în momentul testării. Cultura în bulion trebuie să fie bine dezvoltată și să aibă un aspect omogen. În cazul folosirii *B. subtilis* ca microb-test, se va face o suspensie în ser fiziologic dintr-o cultură de 4-6 zile pe geloză simplă. Suspensia va avea gradul de opacitate al vaccinului T.A.B. și va fi ținută 30 de minute la 60°, pentru a distruge formele vegetative. Această suspensie-etalon se poate păstra o lună la 4° și prezintă avantajul, față de stafilococul auriu că nu mai necesită treceri săptămînale sau în preziua testării.

Prepararea etalonului de penicilină. Soluția-etalon de penicilină se prepară în mod steril, de preferință din fiola care conține etalonul de penicilină (sare de sodiu). Exemplu: presupunem că etalonul de penicilină conține 1.545 u./mg, iar noi am cîntărit 50 mg din etalon. Vom avea deci, 1545 × 50 = 77 250 u./penicilină în 50 mg substanță. Se dizolvă substanța în 7,72 ml apă distilată sterilă sau soluție sterilă de tampon-fosfat, realizîndu-se o soluție-mamă cu conținut de 10 000 u. penicilină/ml. Această soluție, păstrată la 4°, poate fi utilizată 15 zile. În momentul efectuării dozării, din această soluție se trece 1 ml într-un balon cotat steril de 100 ml, completîndu-se pînă la semn cu apă distilată sterilă. Se realizează o soluție de penicilină conținînd 100 u./ml, din care se ia un mililitru, și se amestecă într-un balon cotat steril de 50 ml cu 49 ml apă distilată sterilă, realizîndu-se o soluție de penicilină de 2 u./ml, ceea ce reprezintă diluția de lucru. Diluția de lucru poate fi păstrată la rece + 4° maximum 24-48 de ore.

Mediul de cultură folosit la testare va fi următorul :

1 000 ml bulion glucozat $5^0/_{00}$ pH=7,5
100 ml soluție apoasă roșu fenol $1^0/_{00}$ (sterilizat 20 de minute la 120°)
50 ml soluție acid paraaminobenzoic $2^0/_{00}$ (sterilizat 20 de minute la 120°)

Tehnica de lucru. Se va descrie tehnica testării penicilinei, tehnică aplicabilă și pentru testarea celorlalte antibiotice: streptomicină, cloramfenicol, aureomicină, teramicină, tetracicline etc., cu deosebirea că scara-etalon se va face la fiecare din diluțiile succesive ale antibioticului respectiv.

Determinarea se efectuează în 18 tuburi de hemoliză (9 pentru testarea propriu-zisă și 9 pentru scara-etalon de antibiotic) după tabelul 107

TABELUL 107

Seria etalon antibiotic

Nr. tubului	1	2	3	4	5	6	7	8	M
Mediu de cultură cu roșu fenol (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Soluție penicilină etalon 2 u./ml (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	se aruncă
Cultură stafilococ auriu diluție 1/1 000	cîte 2 picături în fiecare tub								
Diluție realizată	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	—

Seria de testat

Nr. tubului	1	2	3	4	5	6	7	8
Mediu de cultură cu roșu fenol (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
Ser de cercetat (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
Cultură stafilococ auriu diluție 1/1 000	cîte 2 picături în fiecare tub							
Diluții finale ale serului	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256

În fiecare tub din cele două serii se pune cîte 1 ml de mediu de cultură cu indicator roșu fenol. În seria de testat, cu o pipetă gradată de 2 ml, sterilă se repartizează în tubul nr.1, 1 ml ser de cercetat, se amestecă bine și apoi cu aceeași pipetă, se trece din amestec 1 ml în tubul nr. 2, și așa mai departe, pînă la tubul nr. 8. Din tubul nr. 8, după amestec se aruncă 1 ml. Astfel, în această serie de tuburi vom obține o diluție finală din serul de cercetat de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256. Tubul nr. 9 servește ca martor pentru creșterea tulpinii test.

Pentru seria etalon se va lua 1 ml din soluția de penicilină care conține 2 u./ml și se adaugă în tubul nr. 1 din seria-etalon. Se amestecă și de aici se trece 1 ml în tubul nr. 2, și așa mai departe, pînă la tubul nr. 8, din care se aruncă 1 ml. Se vor obține astfel o serie de diluții cu concentrațiile de 1 ; 0,5 ; 0,25 u... 0,0075 u./ml mediu de cultură. Tubul nr. 9 va servi ca martor pentru creșterea bacteriană. Apoi, în fiecare din cele 16 tuburi se vor adăuga cu o pipetă sterilă, evitînd atingerea pereților tuburilor, cîte 2 picături din diluția de 1/1 000 a unei culturi de 18-20 de ore de stafilococ auriu în bulion glucozat.

Citirea se face după 18—20 de ore de termostatare la 37°, notîndu-se cu minus (—) tuburile în care nu s-a produs virajul din roșu în galben și cu plus (+) cele în care mediul a virat din roșu în galben (tuburile care conțin concentrații subbacteriostatice de penicilină).

Martorul trebuie să prezinte totdeauna un viraj net spre galben și mediul tulbure.

Pentru a se calcula numărul de unități de penicilină conținute pe mililitru în serul examinat, se procedează astfel : se înmulțește concentrația limită de penicilină-etalon care a inhibat creșterea stafilococului auriu (în tabelul nostru, 0,03 u.), cu numărătorul fracției care reprezintă diluția limită de ser cu activitate inhibitoare (1/8 în cazul nostru).

Adică : $0{,}03 \times 8 = 0{,}24$ u./ml ser

În cazurile în care s-au administrat doze masive de antibiotic și deci serul bolnavului ar conține peste 1 u./ml de ser sanguin, se va face o scară de diluții pentru penicilina-etalon, pornindu-se de la 10 u./ml în primul tub.

Pentru celelalte antibiotice se va proceda ca în cazul testării penicilinei, cu deosebirea că în seria-etalon se va pleca de la o soluție inițială, care va conține 100 γ/ml.

Exemplificăm cele expuse prin datele prezentate în tabelul 109.

Metodă pentru testarea sensibilității unei tulpini microbiene față de asociațiile de antibiotice. Datorită faptului că în tratamentele antiinfecțioase moderne se folosește tot mai mult metoda asocierii antibioticelor, în vederea obținerii unui sinergism de acțiune, considerăm util să reproducem, după V. Chabbert, determinarea procentajului de supraviețuire a bacteriilor puse în contact cu asociații de antibiotice uzuale. Tehnica este următoarea :

— Se prepară în apă distilată sterilă următoarele soluții-mamă de antibiotice :

Penicilină	200 u.o./ml
Cloramfenicol	300 γ/ml
Streptomicină	200 γ/ml
Teramicină	100 γ/ml

— Se diluează într-un tub cu 25—30 ml bulion cu 0,1 ml din cultura de 24 de ore în mediu lichid a tulpinii microbiene de studiat.

— Se repartizează cîte 4,5 ml din diluția de mai sus în 4 tuburi sterile.

TABELUL 108

Nr. tuburilor	1	2	3	4	5	6	7	8	M
Seria penicilinei etalon (u.i.)	1 —	0,5 —	0,25 —	0,125 —	0,06 —	0,03 —	0,015 +	0,0075 +	
Seria serului de cercetat	1/2 —	1/4 —	1/8 —	1/16 +	1/32 +	1/64 +	1/128 +	1/256 +	M

TABELUL 109

Antibioticul	Tulpini foarte sensibile	Tulpini sensibile	Tulpini «limită»	Tulpini rezistente
	concentrația inhibitoare cuprinsă între :			
penicilină (u./ml)	0,1	0,1–1	1–10	10
streptomicină (γ/ml)	3	3–16	10–100	100
cloramfenicol (γ/ml)	6	6–15	15–100	100
tetraciclină (γ/ml)	1,5–2	1,5–8	8–100	100
aureomicină (γ/ml)	1,5–2	1,5–8	8–100	100
teramicină (γ/ml)	1,5–2	1,5–8	8–100	100
eritromicină (γ/ml)	0,1–0,5	0,5–5	5–10	10

– Se adaugă în primul tub 0,5 ml din soluția-mamă de penicilină, ceea ce face să avem o concentrație de 20 u.o. penicilină pe ml. În tubul nr. 2 se adaugă 0,5 ml streptomicină, și așa mai departe. Nu se va uita să se amestece bine antibioticul cu cultura, prin aspirații și refulări repetate cu pipeta.

– Pe un stelaj pregătim 10 tuburi de hemoliză sterile numerotate 1–10, și repartizăm bulionul cu antibiotice și cultură conform tabelului 110.

Tuburile nr. 1, 2, 3, 4 conțin penicilină pură sau asociată.

Tuburile nr. 2, 5, 6, 7 conțin streptomicină pură sau asociată.

Tuburile nr. 3, 6, 8, 9 conțin cloramfenicol pur sau asociat.

Tuburile nr. 4, 7, 9, 10, conțin teramicină pură sau asociată.

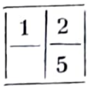
Din diluția în bulion inițială (fără adaos de antibiotice) efectuăm un martor al inoculului microbian astfel:

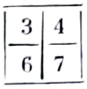
Pe o placă Petri cu geloză simplă, împărțită în 4 sectoare, A, B, C, D, se însămînțează cu ansa în sectorul A o picătură ca atare, în sectorul B o picătură din diluția 1/10, în sectorul C o picătură din diluția 1/100 și în sectorul D o picătură din diluția 1/1000. Atît stelajul cu tuburile de hemoliză, cît și placa cu agar se incubează 24 de ore la 37°.

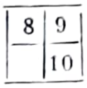
După acest interval controlăm placa de agar însămînțată cu cele 4 diluții de inocul și ne dăm astfel seama după numărul coloniilor, de bogăția inoculului.

Cît privește tuburile, se face citirea și se iau în considerație numai acele tuburi în care bulionul este limpede și aparent lipsit de creștere bacteriană. Tuburile care prezintă turbiditate denotă existența multiplicării bacteriene și deci este vorba de rezistența tulpinii la antibioticele testate.

Pentru a decela bacteriile care supraviețuiesc, se ia cu ansa o picătură din fiecare tub cu bulion limpede și se însămînțează pe geloza a 3 cutii Petri împărțite în sectoare, astfel:







După o incubație de 24 de ore la 37°, se compară densitatea coloniilor obținute în fiecare sector, cu densitatea coloniilor din sectoarele A, B, C, D ale plăcii martor.

TABELUL 110

Numărul tubului		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bulion însămînțat cu adaos de (ml)	penicilină (P)	1	1	1	1						
	streptomicină (S)		1			1	1	1			
	cloramfenicol (C)			1			1		1	1	
	teramicină (T)				1			1		1	1
Bulion însămînțat fără adaos de antibiotice (ml)		1				1			1		1
Asociații realizate: în u.o. pentru penicilină; în γ pentru celelalte antibiotice		P_{10}	P_{10} S_{10}	P_{10} C_{15}	P_{10} T_5	S_{10}	S_{10} C_{15}	S_{10} T_5	C_{15}	C_{15} T_5	T_5

În interpretarea testului se ține seama dacă densitatea coloniilor este egală cu cea obținută la martor, astfel:

a) cu bulionul însămînțat ca atare = supraviețuire 100%;

b) cu bulionul diluat 1/10 = supraviețuire 10%;

c) cu bulionul diluat 1/100 = supraviețuire 1%;

d) cu bulionul diluat 1/1 000 = supraviețuire 0,1%;

e) absența coloniilor corespunde la mai puțin de 0,1% supraviețuire.

Spunem despre o asociație de antibiotice că este *indiferentă* dacă procentajul de supraviețuire este același pentru asociație, ca și pentru fiecare antibiotic în parte.

Considerăm că este vorba de *antagonism* atunci cînd procentajul de supraviețuire este superior, în asociație, celui obținut cu antibioticul cel mai activ.

Și în sfîrșit, apreciem ca *efect sinergic*, cînd procentajul de supraviețuire în asociație este inferior celui obținut cu antibioticul izolat cel mai activ.

TABELUL III

Corespondenţa între dozele terapeutice uzuale şi nivelul concentraţiei în umori pentru antibioticele folosite curent în practică (adaptat după Chabbert)

Denumirea ştiinţifică	Microorganism producător	Doze terapeutice uzuale	Nivelul concentraţiei în umori			
			ser sanguin/ml	urină la 100 ml	lichid cefalorahidian raportat la concentraţie serică	fecale în mg/gram fecale
Penicilină	*Penicillium notatum-chrysog.*	100 000 i.m. 1 milion i.m. 10 milioane i.v.	0,1–1 u.o. 1–10 u.o. 10 u.o.	70 u.o.	1/10	—
Streptomicină	*Streptomyces Griscus*	1,5 g i.m./24 ore	3–10 γ	50 γ	1/10	—
Neomicină	*Str. Fradiae*	2 g i.m./24 ore	3–15 γ	50 γ	1/10	
Clortetraciclină	*Str. Aureofaciens*	2 g peroral/24 ore	1,5–6 γ	10 γ	1/20	0,7
Oxitetraciclină	*Str. Rimosus*	2 g peroral/24 ore	1,5–8 γ	20 γ	—	1–2
Tetraciclină	*Str. Albo-Niger*	2 g peroral/24 ore	2–10 γ	20 γ	1/10	1–2
Cloramfenicol	*Str. Venezuelae*	2 g peroral/24 ore	6–15 γ	10 γ	1/2–1/3	0,1
Novobiocină	*Str. Niveus*	1 g peroral/24 ore	10–50 γ	20 γ	1/10	—
Eritromicină	*Str. Erythreus*	1,5 g peroral/24 ore	0,5–4 γ	30 γ	1/10	0,4
Carbomicină	*Str. Halstedii*	1,5 g peroral/24 ore	0,1–0,5 γ	1 γ	0	
Spiramicină	*Str. Ambofaciens*	3 g peroral/24 ore	2–3 γ	—	—	
Oleandomicină	*Str. Antibioticus*	2 g peroral/24 ore	1–3 γ	—	—	
Bacitracină	*B. Licheniformis*	25 000 i.m.	0,25–1 γ	40	—	—

BIBLIOGRAFIE

BALŞ M. — Introducere în studiul bolilor infecţioase, Ed. medicală, Bucureşti, 1958, p. 324—350 şi 487—507.

BALŞ M. — Antibiotice şi chimioterapice, *Viaţa med.*, 1956, nr. 4, p. 3—17.

BALŞ M. — Studiul procentual al chimiorezistenţei unor germeni rezistenţi faţă de antibioticele uzuale urmărite în decursul ultimilor ani, *Microbiologia (Bucureşti)*, 1959, nr. 6, p. 519—527.

BALŞ M., HORODNICEANU T. — Antibiograma în clinică, *Viaţa med.*, 1958, nr. 9, p. 845—854.

BERCEANU ŞT. — Principii biologice actuale în terapia cu antibiotice, importanţa lor pentru o corectă folosire şi evitarea abuzurilor, *Med. internă (Bucureşti)*, 1958, nr. 11, p. 1 601—1 615.

BOTEZ GH., TEODOROVICI GH., LUPUŞOR GH., NIŢESCU S., BERNESCU E. — Prepararea tabletelor cu antibiotice pentru determinarea sensibilităţii bacteriilor prin metoda difuzimetrică, *Microbiologia (Bucureşti)*, 1959, nr. 2, p. 163—170.

BREEVA L.G. — Caracteristici comparative ale metodelor folosite pentru determinarea sensibilităţii faţă de antibiotice la bacteriile dizenterice, *Antibiotiki*, 1961, nr. 1 p. 72.

DĂNILĂ P. — Contribuţie la micrometoda pentru determinarea concentraţiei de penicilină în sînge prin metoda diluţiilor, *Microbiologia (Bucureşti)*, 1957, nr. 4, p. 367—370.

GASTINEL P. — Précis de Bactériologie Médicale, Ediţia a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 1 201—1 214.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, Ediţia a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 682—704.

IONESCU R., POPESCU SANDA — Consideraţii cu privire la tratamentul antimicrobian al infecţiilor cu germeni neizolaţi, *Viaţa med.*, 1962, nr. 6, p. 313—319.

KOCETKOVA G. N., NOVIKOVA C. Y. — Determinarea activităţii antibacteriene a gramicidinei C prin metoda difuziunii în agar, *Antibiotiki*, 1960, nr. 2, p. 120.

KORCIAGHIN V. B., KOROBITSKAIA A. A., DRUZHININA E. N., SEMENOV S. M. — O metodă cantitativă pentru determinarea neomicinei în lichidele de cultură. *Antibiotiki*, 1962, nr. 2, p. 124.

MACKIE J. T., MC CARTNEY E. J. — Handbook of Practical Bacteriology, Ediţia a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 278—281.

MESROBEANU I. — Noi antibiotice active contra stafilococilor rezistenţi la penicilinele obişnuite, *Microbiologia (Bucureşti)*, 1961, nr. 1, p. 79—97.

NESTORESCU N. şi colab. — Bacteriologie medicală, Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 146—148 şi 149—152.

O.M.S. — Série de Rapports Techniques, Nr. 210 : Standardisation des tests de sensibilité bactérienne. (Deuxième rapport du Comité d'experts des antibiotiques), O.M.S. Genève, 1961.

OTTE G., KOHLER I. — Die Praxis des Resistenz und Spiegelbestimmungen zur Antibiotischen Therapie, Ed. G. Fischer, Jena, 1958.

RUSU V., ANDRONESCU C. — Consideraţii asupra evoluţiei chimiosensibilităţii unor germeni patogeni izolaţi într-un spital de boli contagioase, *Viaţa med.*, 1961, nr. 16, p. 859—867.

SATIK V. V. — Determinarea cantitativă a antibioticului 26/1 prin metoda difuziunii în agar, *Antibiotiki*, 1961, nr. 12, p. 1 123.

STOIA GH. — Rolul laboratorului în conducerea tratamentului cu chimioterapice. *Med. internă* (*Bucureşti*), 1957, nr. 3, p. 401—416.

TEODORESCU ŞT., CONU A., GHEORGHIU GH., NICOLESCU F., BĂDĂNOIU AL. — Importanţa practică a antibiogramei în dermatologie, *Viaţa med.*, 1959, nr. 7, p. 667—670.

VALERIU ANA — Noile peniciline şi aplicările lor în terapeutică, *Spitalul* (*Bucureşti*), 1961, nr. 2, p. 141—145.

VLASOVA I. V. — Studiu comparativ asupra a trei metode de determinare a sensibilităţii bacteriene faţă de antibiotice, *Antibiotiki*, 1961, nr. 6, p. 513.

WHITBY L., HYNES M. — Medical Bacteriology, Ediţia a 6-a, Ed. Churchill, Londra, p. 102—120.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Imunologie und Epidemiologie, 1959, G. Thieme, Leipzig, p. 143—160.

WOLF A., LORIAN V., VASILESCU EF. — Antibiograma în supuraţiile bronhopulmonare. *Med. internă* (*Bucureşti*), 1957, nr. 12, p. 1 836—1 840.

* * * — Antibioticele, Ed. medicală, Bucureşti, 1958.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECŢIILE MICROBIENE

RELAŢIILE ECOLOGICE ALE ORGANISMULUI UMAN CU FLORA MEDIULUI ÎNCONJURĂTOR. FLORA NORMALĂ A ORGANISMULUI

Bacteriile sînt microorganisme larg răspîndite; în natură ele apar oriunde există condiţiile minime care permit viaţa şi probabil că reprezintă formele cele mai elementare de viaţă.

Aceste microorganisme sînt permanent angajate în uriaşul proces de descompunere a substanţelor organice complexe în elemente simple, şi de sinteză a compuşilor organici noi. În lipsa variatelor şi complexelor activităţi metabolice ale bacteriilor, viaţa ar dispărea, atît în mediul acvatic, cît şi pe sol.

Datorită metabolismului unor specii bacteriene apar modificări profunde în condiţiile mediului extern, care influenţează şi condiţionează chiar dezvoltarea altor specii microbiene şi parţial, a florei şi faunei caracteristice mediului.

Pe studiul acestor interrelaţii complexe dintre microorganisme şi mediul înconjurător se bazează astăzi descoperirea a numeroase substanţe cu acţiune antibiotică, cu largă aplicare în terapeutica antiinfecţioasă modernă.

Interrelaţiile complexe dintre diferitele specii microbiene pot fi schematizate în 3 grupuri mari de relaţii: *neutre, antagonice şi sinergice*. Foarte puţine specii microbiene au relaţii neutre între ele; de obicei ele se influenţează indirect, prin faptul că una consumă mai repede decît alta acelaşi substrat nutritiv comun. Ele intervin astfel pasiv sau indirect în creşterea şi dezvoltarea altor specii, lipsindu-le de substratul nutritiv necesar.

Majoritatea speciilor microbiene saprofite şi patogene manifestă interrelaţii de tip antagonic. Se pare că există însă şi aci relaţii diferenţiate între genuri şi specii. De pildă, se ştie că majoritatea antibioticelor care distrug bacteriile sînt elaborate de ciuperci şi că antibioticele secretate de bacterii omoară ciupercile. Pasteur şi Joubert, în 1877, au fost primii care au semnalat fenomenul relaţiilor antagonice dintre unele specii bacteriene saprofite şi patogene, ca de exemplu acţiunea antagonică a b. piocianic asupra b. antraxului sau a *Str. viridans*, asupra bacilului difteric. Antagonismul între cocii gram-pozitivi şi bacilii gram-negativi este un lucru bine cunoscut astăzi (stafilococ-colibacil etc.).

Interrelaţiile de tip sinergic trebuie înţelese ca o cooperare între două sau mai multe specii microbiene, care duce la un rezultat pe care nici una din aceste specii nu este capabilă să-l realizeze singură.

Exemple de astfel de rezultate, bazate pe activitate sinergică, se întîlnesc în activitatea de sinteză a unor compuşi organici complecşi sau de degradare a unor substanţe organice complexe. În viaţa bacteriilor patogene se cunosc, de asemenea, astfel de exemple, cînd o specie patogenă modifică reactivitatea organismului în aşa fel, încît favorizează exercitarea acţiunii patogene unei a doua specii, care fără activitatea pregătitoare a primei specii, nu este capabilă să-şi manifeste patogenitatea.

Un alt exemplu, mai puţin complex, de interrelaţii sinergice îl constituie asociaţia microbiană în care speciile aerobe consumă oxigenul din ţesuturi şi creează astfel condiţiile favorabile de anaerobioză necesare dezvoltării speciilor anaerobe patogene, care determină la om gangrena gazoasă.

Termenul de sinergism în patologia infecţioasă poate fi înţeles şi în sens mai restrîns, adică două sau trei microorganisme care, în mod obişnuit, nu manifestă nici un efect nociv ca specii separate, dar prin asociere produc infecţia, ca rezultat al unui efort de cooperare. Aşa este cazul anginei Vincent sau angina fuzo-spirilară. Relaţiile ecologice dintre microorganisme şi plantele superioare, animale şi om pot fi schematizate în 4 tipuri: *comensalism*, *simbioză, parazitism şi oportunism.*

Prin comensalism s-ar înţelege o asociaţie între o specie bacteriană şi un organism superior animal sau vegetal. Exemple de comensalism sînt extrem de numeroase în natură; flora bacteriană intestinală la om şi mamifere este un exemplu caracteristic.

Termenul de simbioză se foloseşte pentru a caracteriza interrelaţiile dintre o bacterie şi organismul superior pe care trăieşte, cînd ambele organisme beneficiază din aceste interrelaţii. Simbioza dintre bacteriile fixatoare de azot şi plantele leguminoase este un exemplu clasic, folosit de toate manualele. Microorganismele care trăiesc intracelular în celula-gazdă, cum este cazul rickettsiilor, ale anumitor insecte şi crustacee, ca şi unele virusuri ale animalelor şi plantelor.

Prin parazitism se înţelege capacitatea unor microorganisme de a trăi şi a se înmulţi într-un organism superior, pe socoteala căruia se hrănesc. După Pavlovski, fiinţele parazite sînt fiinţe adaptate la un fel particular de viaţă, la un nou mediu de viaţă, pe care el îl denumeşte „entosferă''. Aşa cum în natură există animale şi plante adaptate la geosferă sau la hidrosferă, există şi unele adaptate la entosferă.

În această concepţie, boala organismului parazitat reprezintă de fapt un epifenomen, o excepţie a unui fenomen larg răspîndit în natură. În majoritatea cazurilor de parazitism se realizează un echilibru între organismul parazitat şi parazit. Fenomenul morbid, în această concepţie, nu ar fi decît o dereglare temporară a interrelaţiilor de echilibru care se stabilesc între organismul superior şi cel inferior, interrelaţii care sînt inerente cîtă vreme organismele coexistă în acelaşi mediu ambiant.

Relaţiile de oportunism ar fi o noţiune încă incomplet precizată, prin care se înţelege că specii bacteriene, care în mod obişnuit nu sînt capabile să producă tulburări în organismul uman sănătos, datorită scăderii rezistenţei fiziologice a acestuia pot deveni accidental patogene. Asemenea exemple se dau în cazul colibacilului intestinal sau ciupercilor din genul *Candida* din cavitatea bucală.

FLORA BACTERIANĂ A ORGANISMULUI UMAN SĂNĂTOS

Omul trăind într-un mediu ambinat în care vine în contact permanent cu aer, apă şi sol, organismul său este supus unui contact continuu şi variat cu nenumăratele specii de microorganisme şi bacterii care fac parte integrantă din acest mediu.

Pentru majoritatea speciilor microbiene din mediul înconjurător, cavităţile naturale, tegumentele şi mucoasele organismului uman reprezintă un receptacol temporar. Pentru unele specii bacteriene organismul uman reprezintă un mediu de viaţă nou, favorabil, la care ele caută să se adapteze mai mult sau mai puţin complet. Toate acestea reprezintă ceea ce denumim astăzi flora normală a organismului uman.

Din păcate, cunoştinţele noastre asupra acestei flore sînt încă fragmentare şi incomplete. Dificultatea cea mai mare de care ne izbim în prezent este insuficienţa mediilor de cultivare pentru această floră. Aşa cum este astăzi concepută compoziţia mediilor de cultură, ea este prea îngustă pentru a cuprinde multiplicitatea acestei flore bogate şi variate. Încercările făcute pînă în prezent ne-au arătat că, făcînd însămînţări din acelaşi loc al organismului pe un tip de mediu de cultură, se dezvoltă predominant unele specii microbiene, iar cînd folosim alt tip de mediu de cultură, alte specii microbiene. De aci, constatări fragmentare şi lipsa încă a unei unităţi de concepţie în problema acestei flore. Ceea ce însă rămîne valabil este faptul că această floră există, este complexă şi variată şi reflectă interrelaţiile organismului nostru cu mediul ambiant.

Cunoaşterea cît de cît a acestei flore normale este necesară medicului de laborator, pentru evitarea unor erori în diagnosticul bacteriologic şi în interpretările clinice ale acestui diagnostic.

FLORA NORMALĂ A PIELII

Multe specii bacteriene saprofite din sol, apă şi aer pot fi întîlnite ca oaspeţi temporari, dar niciodată permanenţi ai tegumentelor umane. Bacilii *subtilis*, *mycoides* și *cereus* pot fi întîlniți accidental în leziunile cutanate și este important să-i diferențiem în cadrul diagnosticului bacteriologic de bacilul antraxului.

Culturile făcute de pe pielea normală pun în evidență existența unor specii bacteriene variate ca bacili difterimorfi (*C. cutis*) și stafilococi aerobi și anaerobi; sarcine; *Esch. coli*; *B. proteus*; micobacterii saprofite; *Staphilococcus epidermidis albus*; *Candida albicans* etc. Aceste organisme sînt, obișnuit, bacterii comensale, dar uneori, în leziunile pielii, pot deveni accidental patogene. Micobacteriile saprofite sînt microbi acido-rezistenți comensali, care se întîlnesc mai ales în conductul auditiv extern, pe pielea regiunii genitale și axilare.

Uneori pielea feței și a gîtului, ca și a degetelor, în jurul unghiilor, este purtătoare de streptococi pneumococi și stafilococi patogeni care au fost transferați pe piele, din nas.

FLORA NORMALĂ A FOSELOR NAZALE A RINO-FARINGELUI ȘI A SINUSURILOR ÎNVECINATE

O dată cu aerul inspirat, mucoasele foselor nazale, rino-faringiene și ale căilor respiratorii superioare rețin o cantitate imensă de microbi care sînt vehiculați de aerul din mediul ambiant. O parte din aceste bacterii sînt reținute, o dată cu particulele în suspensie, de firele de păr ale foselor nazale, o altă parte, de secrețiile mucoaselor foselor nazale și rino-faringelui și în sfîrșit, ultima parte a acestor bacterii sînt reținute și eliminate o dată cu secrețiile mucoase ale căilor respiratorii superioare.

Practic, aerul care intră în trahee, bronhii, alveolele pulmonare și în sinusurile nazale și mastoide este aproape steril la indivizii normali. Anumiți indivizi la care au loc unele tulburări fiziologice sau leziuni inflamatoare la nivelul acestor mucoase, care fac ca mucoasele să-și diminueze sau să-și piardă funcția normală de eliminare a microorganismelor care pătrund cu aerul, devin purtători de streptococi hemolitici sau de stafilococi patogeni. Ei elimină în mediul înconjurător cantități mari de microbi patogeni, prin tuse, vorbit și strănut și constituie adeseori surse de infecție permanente, care întrețin focare endemo-epidemice de infecție. În mod obișnuit, nazofaringele trebuie considerat, ca locul de habitat normal al bacteriilor patogene care determină infecții respiratorii. Omul reprezintă izvorul primar de infecție al acestor bacterii, iar convalescenții după o infecție de tip respirator și mai ales purtătorii sănătoși mențin rezervorul acestor infecții în natură. Unii indivizi poartă tulpini patogene ani de zile, sînt purtători cronici; majoritatea însă poartă periodic bacterii patogene și sînt denumiți purtători intermitenți. Mai frecvent se întîlnesc purtătorii de stafilococ, streptococ, difteric, *H. influenzae*, pneumococ, meningococ și *Klebsiella*.

Anumite bacterii gram-negative din tractul intestinal ca *Pseudomonas*, *Esch. coli*, bacterii coliforme sau *B. proteus* pot fi întîlnite ocazional în rinofaringe. Uneori, după tratamentele intense cu penicilină aceste bacterii ajung să predomine în flora rino-faringelui. Nazofaringele nou-născutului este steril la naștere, dar după cîteva zile apare flora comensală obișnuită și eventual flora patogenă, pe care o poartă mama în rino-faringe. În cursul primei și al celei de-a doua copilării, pînă la adolescență, procentajul de purtători de floră bacteriană patogenă este mult mai mare la copii decît la adulți.

FLORA NORMALĂ A CAVITĂȚII BUCALE

Flora normală a gurii conține numeroase bacterii comensale și patogene. Cel mai des se întîlnesc micrococi pigmentați și nepigmentați, majoritatea aerobi, unii anaerobi. De asemenea, se întîlnesc bacili sporulați aerobi gram pozitivi, bacili coliformi, *B. proteus*, și lactobacili.

În criptele amigdaliene și în pliurile gingivale dintre dinte și alveolă se creează condiții de microaerofilie și anaerobioză atît de favorabile, încît o numeroasă floră anaerobă, alcătuită din variate specii bacteriene, este permanent instalată aici. Această floră este reprezentată de micrococi anaerobi, de streptococi anaerobi și microaerofili, vibrioni, bacili fuziformi, spirili, borelii și treponeme.

În cadrul acestei flore, un loc special îl ocupă grupul sinergic de bacterii fuziforme și de spirochete. Din acest grup prezintă o importanță deosebită, pentru diagnosticul bacteriologic, *Treponema microdentium*, o spirochetă saprofită care, din punct de vedere morfologic, nu poate fi deosebită de *Treponema pallidum*. Ca o consecință a acestei constatări, examenul microscopic pe cîmp întunecat, care s-ar putea efectua din leziunile sifilitice ale mucoasei bucale, își pierde din valoarea practică, din cauza posibilității de confuzie cu *T. microdentium*.

Dintre ciupercile parazite și potențial patogene pentru om se întîlnesc unele specii ca *Geotrichum*, *Candida* sau *Actinomyces*.

Gura copilului, la naștere, nu este sterilă; ea conține în mod obișnuit aceeași floră care se găsește în vaginul mamei. Aceasta este reprezentată de un amestec de micrococi, streptococi, bacili coliformi și bacili Döderlein. După cîteva zile de la naștere această floră este, treptat, înlocuită de flora care se găsește în cavitatea bucală a mamei.

FLORA NORMALĂ A TUBULUI DIGESTIV

La persoanele sănătoase, stomacul lipsit de hrană nu conține nici un fel de microorganisme. După ingestia alimentelor în stomac pătrund o cantitate mare de bacterii. Majoritatea acestor bacterii provin din salivă, secrețiile nazofaringiene și din alimente. De obicei, majoritatea acestor bacterii sînt distruse de aciditatea sucului gastric sau de enzimele digestive și doar o mică cantitate trec în intestin. În condiții anormale, ca de pildă în cancerul stomacal sau în stenozele pilorice, alimentele reținute în stomac permit dezvoltarea unei flore bacteriene reprezentată de sarcine, levuri și un bacil mare gram-pozitiv, după vechea denumire bacilul Oppler-Boas, care se știe astăzi că este în realitate o varietate de *Lactobacillus acidofilus*. Duodenul, în mod obișnuit steril, se contaminează cu floră bacteriană în cadrul unei infecții a veziculei biliare, în care caz bila infectată aduce bacteriile în duoden.

În intestinul subțire flora bacteriană este reprezentată, în porțiunea sa superioară, aproape exclusiv de enterococi. Pe măsură ce ne apropiem de porțiunea terminală a intestinului subțire, enterococii devin mai numeroși și încep să apară colibacilii, stafilococii, levurile și lactobacilii.

Colonul, umplut cu alimente parțial digerate, devine o adevărată seră de cultură pentru înmulțirea în cantități enorme a florei bacteriene complexe și variate care caracterizează această porțiune a tubului digestiv.

Pentru a decela prezența acestei flore variate și complexe sînt necesare numeroase procedee de cultivare a bacteriilor. Dacă folosim pentru izolare medii uzuale incubate aerob, atunci în această floră par să predomine bacili gram-negativi. Dacă însă se încălzește în prealabil o porțiune din conținutul intestinal, pentru a distruge formele vegetative și însămînțăm pe medii cu adaos de substanțe organice în condiții de anaerobioză, flora conține mai ales clostridii, *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*, *Cl. histolyticum* și *Cl. tetani*. Culturile efectuate pe agar-sînge și incubate anaerob pun în evidență existența lactobacililor microaerofili și anaerobi, a bacteriilor fuziforme, a unor micrococi, a *B. funduliformis* etc.

Ciupercile microscopice sînt reprezentate în acest complex de variate microorganisme, care pot fi puse în evidență prin însămînțări pe mediul Sabouraud incubat aerob și anaerob. Printre speciile mai frecvent întîlnite cităm, în ordinea frecvenței, *Candida*, *Geotrichum*, criptococi, *Penicillium* și *Aspergillus*.

Cu ocazia folosirii tratamentelor prelungite pe cale perorală cu antibiotice cu spectru bacteriostatic larg, cum sînt de pildă cloramfenicolul sau ciclinele, ciupercile microscopice, care sînt insensibile la aceste antibiotice, se înmulțesc considerabil în colon, devin predominante ca floră și pot determina, prin aceasta, o iritație a mucoasei colonului care se traduce printr-o diaree, discretă ca simptomatologie, dar persistentă.

Examenul conținutului intestinal prin metoda microscopiei pe cîmp întunecat pune adeseori în evidență prezența vibrionilor, spirililor, boreliilor și treponemelor, care sînt similare, dar nu identice cu cele întîlnite în cavitatea bucală. O proporție de 1–2% din populația sănătoasă, poate fi purtătoare de specii patogene de *Salmonella* sau *Shigella*, pe care le elimină intermitent. Flora intestinală a copilului nou-născut se stabilește aproximativ în intervalul de 6 – 24 de ore după naștere. Flora bacteriană invadează organismul, în parte, pe cale orală și în parte, pe cale ascendentă, prin orificiul anal.

Lactobacilii, în special *Lactobacillus bifidus*, constituie marea majoritate a florei intestinale la nou-născutul alimentat la sîn, restul florei poate fi reprezentată de enterococi, colibacili și stafilococi. La copiii alimentați artificial, *Lactobacillus bifidus* este înlocuit cu *Lactobacillus acidofilus*, colibacili și enterococi. Semnificația florei intestinale normale a fost multă vreme controversată; astăzi, deși nu se cunosc toate funcțiile ei, se știe că are rol important în fiziologia digestiei și în sinteza unor vitamine hidro- și liposolubile.

Prin diferite metode de cercetare și în special prin sterilizarea parțială a intestinului prin tratament cu sulfaguanidină, formosulfatiazol și alte sulfamide, s-a putut dovedi că *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* și alți coliformi, sintetizează mari cantități de vitamine din complexul B : tiamina, riboflavina, acidul nicotinic, piridoxina, acidul pantotenic, biotina, acidul folic și inozitolul. Vitamina liposolubilă K este de asemenea sintetizată de bacteriile intestinale.

Scăderea bruscă, cantitativ, a florei intestinale, care se realizează o dată cu administrarea antibioticelor cu spectru larg de activitate antimicrobiană, determină apariția, în cîteva zile, a unor deficiențe acute în vitamina K și a celor ale complexului B. Dacă nu se compensează aceste deficiențe vitaminice prin administrarea lor pe cale parenterală sau perorală, se pot instala tulburări serioase în fiziologia tractului intestinal.

Eforturile făcute pentru a steriliza intestinul prin combinații de antibiotice cu spectru larg, în vederea intervențiilor chirurgicale, realizează o acțiune bacteriostatică intensă timp de 2—3 zile, dar ulterior, în ciuda tratamentului susținut cu antibiotice, se selecționează tulpini rezistente la antibioticele folosite care se înmulțesc cu o iuțeală extraordinară.

FLORA NORMALĂ A CĂILOR GENITALE ȘI URINARE

Secreția smegmatică a mucoaselor genitale, atît la bărbat, cît și la femeie conține cele mai adeseori *Mycobacterium smegmatis*, un bacil acidorezistent comensal, care uneori poate fi găsit în sedimentul de urină și confundat cu *Mycobacterium tuberculosis*.

Mucoasa uretrală la femeie este, fie lipsită de floră, fie cu o floră redusă, reprezentată de coci gram-pozitivi. În schimb, mucoasa uretrală la bărbat conține permanent o floră bacteriană mai mult sau mai puțin abundentă, reprezentată din coci gram-pozitivi, bacterii difteroide și uneori, un cocobacil gram-negativ, care poate fi ușor confundat cu gonococul.

Mucoasa vulvară a nou-născutului este sterilă la naștere, dar după 24—48 de ore își formează o floră proprie, din bacteriile din flora normală a pielii, vaginului și intestinului.

Mucoasa vaginală, sterilă și ea la naștere, este rapid invadată de micrococi, enterococi și bacterii difteroide. După cîteva zile însă, datorită depunerii în epiteliul mucoasei vaginale a glicogenului rămas din sîngele circulației materne, apar și se dezvoltă luxuriant, folosind acest substrat nutritiv, bacili mari, gram-pozitiv, Döderlein identificați astăzi ca *Lactobacillus*.

Datorită producerii de acid pe seama fermentării glicogenului de lactobacili, pH local al mucoasei vaginale scade și un răstimp oarecare flora vaginală este similară cu cea a adultului. După ce glicogenul rezidual din circulația maternă dispare, eliminat prin urină, bacilii Döderlein dispar și ei, pH local al mucoasei devine ușor alcalin și flora este reprezentată din micrococi, streptococi hemolitici, coliformi și bacterii difteroide.

La pubertate, datorită modificărilor hormonale fiziologice, glicogenul reapare în epiteliul mucoasei vaginale, pH local redevine acid, prin activitatea metabolică a bacililor Döderlein, care reapar.

Micrococii, coliformii, bacteriile difteroide și unele levuri se mențin ca floră de asociație, alături de lactobacili. După menopauză, flora proprie a mucoasei vaginale se aseamănă din nou cu aceea dinainte de pubertate.

BACTERIILE DIN SÎNGE ȘI ȚESUTURI

În mod accidental, bacterii din flora comensală normală a gurii, rino-faringelui, pot ajunge în sînge și sînt vehiculate pasiv de circulație în țesuturi și organe. În majoritatea cazurilor, aceste bacterii sînt eliminate prin mecanismele normale de apărare a țesuturilor și în special prin fagocitoză, așa că sîngele și limfa sînt practic sterile. În cazul izolării bacteriilor din sînge prin hemocultură, orice bacterie care se dezvoltă în condiții neobișnuite în mediul de cultură trebuie considerată, în primul rînd, ca o bacterie pătrunsă prin contaminare datorită unei defecțiuni în tehnica hemoculturii.

BIBLIOGRAFIE

* * * — Învățătura lui I. P. Pavlov în mdicina teoretică și practică, Ed. științifică, București 1953.

BALȘ M. — Introducere în studiul bolilor infecțioase, Ed. medicală, București, 1958.

BOIVIN A. — Bacterii și virusuri, Editura Jean Leon, București, 1947.

FROBISHER M. — Fundamentals of Microbiology, Ediția a 6-a, Ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 1957, p. 49—57.

GASTINEL P. — Precis de bacteriologie médicale, Ediţia a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 76—86.
GAY P. F. and associates — Agents of disease and host resistance, Ed. Bailliere-Tindall-Cox, Londra, 1950.
GLADSTON. I. — The epidemiology of health, Health Education Council, New-York, 1953, p. 16—38.
HALLMANN L. — Bakteriologie und serologie, Ediţia a 2-a, G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 21—26.
LA VERNE ROTH THOMPSON — Microbiology and epidemiology, Ed. Saunders, Philadelphia, 1958, p. 313—346.
MACKIE T. J., MC. CARTNEY E. J. — Handbook of practical bacteriology, Ediţia a 9-a, Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 3—30.
PASTEUR L. — Pages choisies, Editions sociales, Paris, 1957.
STAMATIN N. — Microbiologie veterinară, Ed. agrosilvică, Bucureşti, 1956.
WERKMANN C. H., WILSON P. W. — Bacterial physiology, Academic Press, New-York, 1951, p. 56—80.
WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie und Epidemiologie, Ed. Thieme, Leipzig, 1959, p. 25—65.

EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL PRODUSELOR PATOLOGICE DIN INFECŢIILE UMANE

A. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE ŞI GANGRENOASE

Exsudatele purulente provin din infecţii ale pielii, furuncule, abcese, piodermite, hidrosadenite, pustulă malignă etc. Plăgile traumatice sînt obişnuit contaminate cu floră aerobă piogenă, dar uneori şi cu flora anaerobă a asociaţiei ce determină gangrena gazoasă şi cu spori ai bacilului tetanic. Adeseori în exsudatele purulente putem întîlni ciuperci patogene ca: actinomicete, blastomicete şi *Sporotrichum.* În mod obişnuit metodele de examen pentru decelarea florei piogene aerobe sînt suficiente. Cînd simptomele clinice sau indicaţiile epidemiologice ne atrag atenţia asupra posibilităţii prezenţei anaerobilor trebuie să extindem cercetările bacteriologice şi pentru decelarea acestei flore.

Examen de orientare şi flora microbiană posibilă. Examenul bacteriologic de orientare se face prin pregătirea frotiurilor directe din produs care se colorează cu Gram şi albastru de metilen. Se fac, de asemenea, însămînţări în bulion glucozat şi pe 1—2 plăci Petri cu geloză-sînge. Se incubează timp de 24—48 de ore la 37° şi se examinează apoi macroscopic coloniile izolate şi microscopic prin frotiuri colorate cu Gram. După aspectul coloniilor (forma de creştere, dimensiunile, tipul hemolizei) şi caracterele morfotinctoriale ale microbului izolat, stabilim un diagnostic de orientare. Identificarea tulpinii izolate şi diagnosticul diferenţial cu speciile înrudite sau cu cele saprofite identice morfotinctorial le efectuăm prin folosirea metodelor speciale descrise pe larg în capitolele metodelor speciale de diagnostic.

Flora bacteriană a exsudatelor purulente poate fi reprezentată de următoarele specii bacteriene:

Aerobe :

1. Stafilococi, frecvent *Staph. aureus*, rar *Staph. albus.*
2. Streptococi, frecvent str. piogen, hemolitic, enterococ.
3. Pneumococ.
4. *B. anthracis* şi bacili antracoizi (*B. subtilis, B. mycoides, B. cereus* etc.).
5. *C. diphteriae* şi difterimorfi (*C. hoffmanni, C. cutis*).
6. B. piocianic (*Pseudomonas aeruginosa*).
7. Col bacil (*Escherichia coli*).
8. B. Proteu (*Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*).

Anaerobi telurici :

1. *Cl. perfringens.*
2. *Cl. histolyticum.*
3. *Cl. oedematiens.*
4. *Cl. sporogenes.*
5. *Cl. novy*
6. *Cl. tetani.*

Anaerobi netelurici :

1. *Spherophorus funduliformis.*
2. *Ramibacterium ramosum.*

B. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL GANGLIONILOR LIMFATICI

Datorită multitudinii speciilor bacteriene incriminate ca factor etiologic, examenul bacteriologic al infecţiilor localizate la ganglionii limfatici trebuie efectuat în strînsă concordanţă cu datele clinice.

Este bine să ţinem seama de faptul că, în majoritatea cazurilor, adenitele supurate apar ca o consecinţă a infectării unei plăgi şi a limfangitei satelite. În caz că examenul bacteriologic de orientare se face imediat după abcedare sau consecutiv inciziei ganglionului, microbul infectant este în cultură pură şi este reprezentat cel mai frecvent de streptococi sau stafilococi. Adenitele cervicale supurate sînt, în mod obişnuit, tributare infecţiilor rinofaringelui, iar puroiul conţine streptococi, stafilococi sau pneumococi. Uneori, însă, adenitele cervicale supurate sînt de fapt adenite tuberculoase suprainfectate cu stafilococi sau streptococi care reprezintă flora cel mai frecvent întîlnită. Este posibil însă să întîlnim şi o floră de asociaţie reprezentată de *B. piocianic*, *E. coli*, *C. pseudodiphteriticum hoffmanni*, *B. Proteus*, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. cereus* etc.

Adenita inghinală supurată poate fi cauzată, fie de gonococi cînd evoluează cu o infecţie gonococică, fie de stafilococi, streptococi sau *E. coli*.

În şancrul moale, puroiul din adenita satelită conţine streptobacilul Ducrey în cultură pură sau asociat cu streptococi şi stafilococi.

În limfadenita, care se întîlneşte în forma ulceroganglionară a tularemiei, examenul bacteriologic poate pune în evidenţă *Pasteurella tularensis* de obicei în asociaţie cu stafilococ sau streptococ. Ganglionii limfatici conţin *Treponema pallidum* în faza primară a infecţiei luetice. Uneori se efectuează puncţia acestor ganglioni care nu supurează decît excepţional pentru a decela pe frotiurile din punctat agentul etiologic al sifilisului.

În adenitele supurate datorită infecţiilor micotice, ca sporotricoza, blastomicoza şi actinomicoza, ciuperca infectantă poate fi uşor pusă în evidenţă în frotiurile din puroi şi o găsim, de obicei, în asociaţie cu streptococi, stafilococi, piocianic, proteu sau alţi microbi de infecţie secundară.

Examenul bacteriologic de orientare. Conţinutul purulent sau nepurulent al ganglionului infectat trebuie recoltat prin puncţie sau incizie. Din produsul patologic se efectuează frotiuri care se colorează cu Gram şi albastru de metilen. Se însămînţează un tub cu bulion glucozat şi 2 plăci cu geloză-sînge. Se incubează aerob la 37°. După 24—48 de ore se controlează macroscopic cu lupa coloniile izolate pe geloză şi microscopic prin frotiuri colorate cu Gram din cultura în bulion şi din coloniile izolate pe geloza sînge. Identificarea se face prin metodele speciale pentru specia sau speciile bacteriene izolate.

Examenul bacteriologic pentru prezenţa bacililor tuberculoşi. Din produsul patologic se efectuează 2 frotiuri pe lame degresate, fără zgîrieturi (preferabil noi). Se colorează după tehnica Ziehl-Neelsen şi se examinează cel puţin 30 de minute pentru prezenţa bacililor acidorezistenţi. În caz că examenul microscopic direct a rămas negativ şi există suficient produs patologic, se poate folosi o metodă de concentrare.

Dacă în frotiuri au apărut bacili acidorezistenţi, prezenţa lor trebuie confirmată prin culturi pe mediul Loewenstein şi prin inoculare la 2 cobai.

În caz că s-a excizat un ganglion, se vor face preparate histopatologice, pentru a decela prezenţa foliculilor tuberculoşi şi a bacililor acidorezistenţi în ţesuturi. Pentru însămînţări şi inoculări la cobai este mai util, în acest caz, să folosim triturat de ganglion decît puroi.

C. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL LEZIUNILOR FISTULIZATE

Fistulele sînt leziuni cu evoluţie cronică infectate obişnuit de o floră microbiană de asociaţie. Ele apar în legătură cu tuberculoza osteoarticulară, osteomielita şi artritele, după intervenţii chirurgicale, în afecţiunile micotice ale pielii etc. În această floră de asociaţie, reprezentată mai ales de b. piocianic, b. pseudodifteric Hoffmann, *Proteus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* etc., este greu de stabilit care a fost specia bacteriană care a determinat infectarea secundară a fistulei. De aceea, este preferabil totdeauna să se efectueze investigaţiile bacteriologice cu fragmente de ţesuturi sau ţesut osos. Dacă lucrul acesta nu este posibil se va căuta să se recolteze, cu ajutorul unor tampoane sterile subţiri, produsul patologic din porţiunile adînci ale traiectului fistulos.

Examenul bacteriologic de orientare se efectuează prin frotiuri colorate cu Gram şi Ziehl-Neelsen şi prin însămînţări în bulion glucozat, geloză-sînge, mediul Loewenstein şi inoculare la cobai. Dacă se bănuiesc ciuperci patogene se adaugă la însămînţări şi mediul Sabouraud.

D. EXAMENUL BACTERIOLOGIC ÎN LEZIUNILE INFLAMATORII OCULARE

Examenul bacteriologic poate fi de folos în clinică în următoarele afecţiuni oculare de origine infecţioasă : blefarite, *Hordeolum chalazion*, conjunctivite, keratite, irite şi dacriocistite. Înaintea intervenţiilor chirurgicale, oftalmologice se practică deseori examenul bacteriologic prin frotiuri şi culturi din sacul conjunctival. Recoltarea secreţiilor şi exsudatelor purulente oculare trebuie efectuată cu grijă de către specialistul oftalmolog.

Flora bacteriană care poate fi întîlnită în infecţiile oculare este destul de numeroasă. Dintre bacteriile gram-pozitive se pot decela : stafilococi, streptococi hemolitici şi nehemolitici pneumococi, *C. diphtheriae*, *C. xerosis*, *B. anthracis*, *B. subtilis* şi ciuperci patogene ca : *Oidium*, *Actinomices*, *Aspergillus* etc. De asemenea, pot fi întîlnite numeroase specii de bacterii gram-negative, reprezentate de : *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria catharralis*, *N. intracellularis*,

B. Morax-Axenfeld (*Moraxella lacunata*), *B. Koch-Weeks* (*Hemophilus Aegypticus*), *H. influenzae*, B. piocianic, *P. tularense*. Dintre bacilii acidorezistenți, bacilul tuberculozei umane.

Examenul bacteriologic de orientare. Frotiurile se fac pe lame subțiri, curate, de obicei 3—4 la număr. În anumite situații se examinează comparativ ochiul bolnav cu ochiul sănătos. Colorația frotiurilor se face cu Gram, albastru de metilen și eventual Ziehl-Neelsen. Însămînțările se fac în bulion glucozat și pe plăci cu geloză-sînge. Cînd se bănuiesc leziuni tuberculoase sau de infecție tularemică, inoculările la cobai sînt obligatorii.

E. EXAMENELE BACTERIOLOGICE ALE EXSUDATULUI NAZAL ȘI ALE SINUSURILOR NAZALE

Etiologia bacteriană a rinitelor și sinuzitelor este destul de larg reprezentată pentru a justifica necesitatea unui examen bacteriologic. În general, recoltarea acestor exsudate trebuie efectuată de către specialistul rinolog. Este de menționat, în special faptul, că în cazurile suspecte de lepră se recoltează exsudatul nazal după ce se provoacă în prealabil o rinită medicamentoasă cu ajutorul iodurii de potasiu pentru a stimula formarea exsudatului. Furunculele atriului nazal sînt datorite stafilococului. Flora gram-pozitivă din nas și sinusurile nazale este alcătuită, în afara stafilococilor, de streptococi, pneumococi, *C. diphtheriae*, *C. pseudodiphtheriae*, *B. subtilis*, iar cea gram-negativă din *Neisseria catharalis*, *N. intracellularis*, *Klebsiella*, b. piocianic, *H. influenzae*, *B. pertussis*, *B. proteus*, *Borrelia vincenti*, *Fusiformis fusiformis*; dintre bacilii acidorezistenți, *Mycobacterium leprae* și *Mycobacterium tuberculosis*.

Examenul bacteriologic de orientare se efectuează prin frotiuri care se colorează cu Gram, albastru de metilen, Ziehl-Neelsen și fucsină fenicată, dacă se bănuiește asociația fuzospirilară Vincent.

Însămînțările se fac în bulion glucozat, pe plăci cu geloză-sînge, mediul Löffler pentru b. difteric. În infecțiile cronice este bine să incubăm și anaerob plăcile cu geloză-sînge. Coloniile izolate se examinează macroscopic și microscopic prin frotiuri colorate cu Gram. Identificările se fac apoi prin metodele speciale pentru fiecare specie izolată în parte. În cazul suspectării unei infecții tuberculoase se vor face inoculări subcutanat la 2 cobai.

F. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL EXSUDATELOR RINOFARINGIENE

Flora exsudatelor rinofaringiene este destul de variată, iar indicațiile clinice ne ajută să eliminăm o parte din speciile încriminate și să ne simplificăm astfel diagnosticul. Flora gram-pozitivă este alcătuită din stafilococi, streptococi, pneumococi, bacili difterici și difterimorfi. Flora gram-negativă mai numeroasă este reprezentată de următoarele specii: *Neisseria catharalis*, *Neisseria intracellularis*, *Neisseria flava* și alte neisserii pigmentate, *H. influenzae*, *B. pertussis*, *B. fusiformis*, *Borrelia vincenti*, b. piocianic, *Proteus*. În plus, cele 2 specii acidorezistente patogene pentru om, *M. tuberculosis* și *M. leprae*.

Examenul bacteriologic de orientare se face prin frotiuri directe din produs colorate Gram, cu albastru de metilen, Ziehl-Neelsen, fucsină fenicată și pentru corpusculii Babeș-Ernst (Del-Vecchio).

Însămînțările vor ține seamă de rezultatele frotiurilor și în afară de bulionul glucozat obișnuit și plăcile cu geloză sînge se vor adăuga mediile adecvate pentru speciile pe care le bănuim, ca de pildă mediul Löffler pentru *C. diphtheriae*. În cazul amigdalectomiei sau a extirpării vegetațiilor adenoide, amigdala extirpată sau fragmentele de țesut adenoid sînt triturate într-un mojar steril cu 9 ml de bulion steril pînă se obține o suspensie omogenă. Din suspensie se însămînțează pe plăci de geloză-sînge prin metoda epuizării ansei. De asemenea se poate face o diluție din suspensie, 0,5 ml suspensie într-un tub cu bulion, se omogenizează bine diluția prin aspirație repetată cu pipeta Pasteur, apoi se toarnă conținutul tubului în 2 plăci Petri sterile, peste care se toarnă geloză-sînge topită și răcită la 45—50°. Se amestecă prin mișcări de rotație a plăcii în ambele sensuri și se lasă să se solidifice mediul. S-a realizat astfel și o cultură în profunzime. Culturile se incubează la 37° aerob și anaerob sau microaerofil și după 24 de ore se cercetează prezența coloniilor streptococului hemolitic, cel mai frecvent agent etiologic al infecțiilor rino-amigdaliene. Identificările și diagnosticul diferențial cu speciile înrudite se fac prin metodele speciale descrise la capitolul respectiv.

G. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL SPUTEI ŞI EXSUDATELOR OBŢINUTE PRIN ASPIRAŢIE BRONHOSCOPICĂ

Recoltarea sputei şi exsudatelor bronşice trebuie să ţină seamă de indicaţiile simptomatologiei clinice pentru a realiza un examen bacteriologic judicios. De pildă, cînd sînt indicaţii clinice de tuse convulsivă este deosebit de important ca, pe lîngă recoltarea obişnuită a tampoanelor cu exsudat, să fie folosită metoda însămînţării directe pe mediul Bordet-Gengou a aerosolilor purtători de microbi proiectaţi de copilul bolnav într-un acces de chintă caracteristică. Flora bacteriană a sputei şi exsudatelor bronşice este deosebit de variată. Bacteriile gram-pozitive sînt reprezentate de stafilococii auriu şi alb, streptococii hemolitici, pneumococi, *Gaffkya tetragena*, *C. diphtheriae*, *C. pseudodiphtheriae Hoffmanni* şi ciuperci patogene ca *Blastomyces*, *Actinomyces*, *Streptotrix*, *Leptotrix bucalis*, *Oidium albicans* etc. Cele gram-negative sînt : *Neisseria catharalis*, *Neisseria intracellularis*, *Klebsiella pneumoniae*, b. piocianic, *B. fusiformis*, *B. Pertussis*, *H. influenzae*, *B. proteus*, *E. coli*, *B. Vincenti*, *Treponema microdentium* şi *Treponema macrodentium*, iar ca acido-rezistenţi *Mycobacterium tuberculosis*.

În diferitele infecţii supurative pulmonare, ca : abcesele pulmonare, bronşiectazie, precum şi în diferitele infecţii cu evoluţie cronică, ca : astm, bronşite cronice, se va ţine seama de posibilitatea prezenţei florei anaerobe şi se va însămînţa obligatoriu, în paralel, aerob, anaerob şi microaerofil. Secreţiile şi exsudatele bronşice aspirate prin bronhoscopie se pretează cel mai bine la examenele bacteriologice prin frotiu şi culturi.

Examenul bacteriologic de orientare. Din produsul patologic se efectuează 3—4 frotiuri pe lame degresate, noi, şi se colorează cu Gram, albastru de metilen, fucsină fenicată şi Ziehl-Neelsen. Frotiul colorat cu albastru trebuie, în mod deosebit, studiat pentru a ne orienta şi cu ajutorul formulei citologice şi al aspectelor procesului de fagocitoză. Însămînţările obişnuite pe bulion glucozat şi geloză-sînge trebuie efectuate în 3 serii, pentru a putea fi incubate aerob, anaerob şi microaerofil. Medii speciale vor fi adăugate în funcţie de indicaţiile clinice. De pildă mediul Löffler pentru difterie, Löwenstein pentru bacilul Koch, Bordet-Gengou pentru *Bordetella* etc.

După 24—48 de ore se controlează cu lupa coloniile izolate pe mediile obişnuite şi speciale şi microscopic prin frotiuri colorate Gram. Se fac subculturi din coloniile izolate pe mediile adecvate, necesare stabilirii caracterelor de specie, criteriilor de patogenitate şi diagnosticului diferenţial cu speciile înrudite.

H. EXAMENUL CITOLOGIC ŞI BACTERIOLOGIC AL LICHIDULUI CEFALORAHIDIAN

Lichidul cefalorahidian se formează în mod fiziologic, pe de o parte, pe seama vaselor plexului coroid din ventriculele creierului printr-un proces de filtrare lentă selectivă, prin membrane permeabile, a plasmei sanguine, iar pe de altă parte prin secretarea lui de însăşi plexul coroid, celulele spaţiilor perivasculare şi de celulele ependimare ale ventriculelor şi canalului ependimar. În congestiile acute şi cronice ale meningelor volumul lichidului cefalorahidian creşte, datorită unui dublu mecanism, pe de o parte prin mărirea permeabilităţii plexului coroid, iar pe de altă parte prin accentuarea procesului de transsudare a plasmei prin pereţii capilarelor.

În infecţiile acute şi cronice ale meningelor volumul lichidului creşte şi prin producerea exsudatului inflamator.

Examenul lichidului cefalorahidian este obligatoriu pentru stabilirea diagnosticului etiologic în toate cazurile de infecţii acute sau cronice ale meningelor fiind însă de mare utilitate şi în aşa-zisele ,,meningisme'' sau ,,meningite seroase''. În toate cazurile de sifilis visceral, examenul lichidului cefalorahidian este hotărîtor pentru stabilirea localizării luesului în sistemul nervos central. Atît de important este acest examen, încît astăzi nu se poate concepe o vindecare reală în sifilisul visceral tratat, decît cu condiţia ca examenele repetate ale lichidului cefalorahidian să fie constant normale, timp de un an după tratament.

Examenul lichidului cefalorahidian este de asemenea util în diagnosticul poliomielitei, sclerozei în plăci, encefalitelor, tumorilor şi abceselor cerebrale, hemoragiei cerebrale, edemului cerebral şi în comele cu etiologie necunoscută.

Examenul citologic. Lichidul cefalorahidian se examinează din punctul de vedere al citologiei sub 2 aspecte : numărul total de elemente celulare conţinut într-un volum de 1 mm^3 de lichid şi formula citologică, adică tipurile principale de celule şi caracterele lor morfotinctoriale.

a) *Numărătoarea elementelor celulare* ale lichidului se va face totdeauna cît mai aproape de momentul recoltării, pentru a evita lizarea elementelor figurate, cît şi coagularea, posibilă la unele lichide. Dacă acest lucru nu este posibil este bine să transvazăm o cantitate de 1—2 ml de lichid recoltat într-un tub de hemoliză curat, uscat şi steril, în care s-a pus un cristal de oxalat de potasiu. În felul acesta se evită apariţia coagulării şi numărătoarea se poate efectua şi după 2—3 ore de la recoltare, fără inconveniente. Cînd lichidul recoltat este hemoragic, numărătoarea nu se mai poate efectua datorită prezenţei leucocitelor din sînge, care falsifică rezultatul. Chiar şi urmele de sînge în lichid pot să devină sursă de eroare importantă în numărătoare, dacă nu se practică hemoliza cu acid acetic. Lichidul cefalorahidian normal conţine puţine elemente celulare, între 0 şi 5 elemente pe mm³. La copii limita superioară este pînă la 8—10 celule/mm³. Celulele lichidului cefalorahidian se prezintă ca nişte limfocite mici, din care cauză au fost socotite de origine hematogenă. Creşterea numărului total de celule peste limitele normale a fost denumită *pleiocitoză*. Pleiocitoza poate fi la limită (între 5 şi 10 elemente), uşor crescută (10—30 de elemente), moderat crescută (30—100 de elemente), accentuată (între 200 şi 500 de elemente) şi mult crescută (cu peste 1 000 de celule/mm³ de lichid nediluat).

Tehnica numărătorii. Se transvazează cu o pipetă Pasteur sterilă 10—15 picături de lichid cefalorahidian într-un tub de hemoliză curat şi steril, se adaugă o picătură de acid acetic, pentru lizarea eventualelor hematii din lichid, şi eventual o picătură mică de albastru de metilen nediluat. Se poate examina lichidul şi fără acid acetic, dar atunci vom întrebuinţa obligatoriu obiectivul 7, pentru a putea distinge cu claritate hematiile de limfocite sau de alte leucocite. Aspirăm şi respingem lichidul de cîteva ori, pentru a asigura o repartiţie uniformă a elementelor figurate şi încărcăm prin capilaritate o celulă de numărat de tip Nageotte sau Fuchs-Rosenthal, speciale pentru lichidul cefalorahidian. În caz că lichidul este foarte tulbure, cu multe elemente, îl diluăm 1/10 sau 1/100 într-o pipetă Potain pentru sînge. Înainte de a începe numărătoarea, după ce am aşezat celula de numărat încărcată cu lichid pe platina microscopului, lăsăm să se scurgă un interval de 3—5 minute, pentru a permite aşezarea elementelor celulare pe suprafaţa reţelei de numărat.

Celula Nageotte (fig. 302) are o înălţime de 0,5 mm şi este împărţită de 40 de dreptunghiuri. Fiecare dreptunghi are un volum de 1,25 mm³. Vom număra, după aceeaşi tehnică ca la elementele figurate ale sîngelui, celulele din 4 pătrăţele. Cifra obţinută o împărţim la 5 şi obţinem numărul elementelor celulare pe mm³.

Celula Fuchs-Rosenthal (fig. 303) are o înălţime de 0,20 mm şi o suprafaţă de 16 mm². Reţeaua este asemănătoare cu aceea a celulei Bürker, volumul celulei este de 3,2 mm³. Aci numărăm toate elementele de pe reţeaua celulei de numărat, împărţim cifra obţinută cu 3 şi obţinem numărul elementelor celulare pe mm³.

Dacă din întîmplare nu dispunem de o celulă Nageotte sau Fuchs-Rosenthal, putem folosi şi camera celulară obişnuită pentru numărătorile de leucocite, Bürker-Türk sau Bürker. În acest caz se numără celulele pe toată suprafaţa lamei, cele 9 pătrate mari egale cu 0,9 mm³, se împarte cifra găsită cu 3, se înmulţeşte cu 11 şi obţinem numărul total de celule într-un mm³ de lichid nediluat.

Interpretarea rezultatelor. Lichid normal = 0—5 elemente pe mm³; reacţia uşoară meningiană = 10—50 de elemente /mm³; reacţia meningiană intensă = 50—500 de elemente/mm³; meningită purulentă, peste 500 de elemente /mm³.

b) *Formula citologică*. Lichidul cefalorahidian recoltat se centrifughează în 2 tuburi sterile de centrifugă. Se îndepărtează supernatantul şi dintr-un tub se foloseşte sedimentul pentru a efectua 4 frotiuri pe lame subţiri, curate şi degresate. Celălalt tub cu sediment se păstrează pentru însămînţări şi inoculări.

Întinderea frotiurilor se efectuează depunînd cu o pipetă Pasteur fin efilată o picătură mică din sediment pe lame curate, degresate şi fără zgîrieturi, dacă se poate lame noi şi apoi se întinde uniform în strat subţire pe suprafaţa lamei, cu ajutorul unei lamele ca la frotiurile de sînge. Uscarea frotiurilor se poate efectua la termostat sau la temperatura camerei. Fixarea se va face cu alcool-eter, timp de 10 minute sau alcool metilic, timp de 2 minute. Coloraţia frotiurilor se va face cu soluţia Giemsa maximum jumătate de minut pentru citologie şi cu Gram şi Ziehl-Neelsen pentru prezenţa bacteriilor.

Pe preparatele astfel colorate se studiază la microscop cu obiectivul de imersie varietăţile de celule şi repartiţia lor la 100 de elemente. După caracterul macroscopic al lichidului, limpede, purulent, hemoragic şi galben-xantocromic, opalescent, se poate încerca o schemă de sistematizare a reacţiilor citologice.

1. *Lichide limpezi, incolore*

Cînd boala are o evoluţie cronică, lichidul poate să nu conţină nici un element celular sau cîteva în limitele normale. Aşa este cazul în ramolismentul cerebral şi hemoragia cerebrală închistată. Alteori, în lichidele clare se poate întîlni o limfocitoză uşoară de 10—50 elemente/mm³, aceasta indicînd o uşoară reacţie meningiană.

O limfocitoză moderată între 31 şi 100 de elemente/mm³ într-un lichid clar şi o evoluţie clinică cronică indică posibilitatea unei meningite cronice sifilitice. Limfocitoză moderată se întîlneşte şi în meningita tuberculoasă. În afară de meningita cronică sifilitică şi meningita tuberculoasă, se mai întîlneşte limfocitoză moderată şi în scleroza în plăci. Cînd lichidul limpede prezintă o formulă cu limfocitoză pură sau însoţită de mononuclează sau polimorfonuclează moderată, fără microbi, trebuie să ne gîndim la o meningită sifilitică cu evoluţie subacută sau la o tuberculoză meningiană. În encefalita epidemică şi în alte encefalite se poate constata apariţia unei limfocitoze moderate sau accentuate chiar de la 15—50 de celule pînă la 200 şi peste /mm³ de lichid. În poliomielita incipientă pleiocitoza poate fi foarte accentuată (între 100 şi 1200 de elemente/mm³). Formula citologică, la început mixtă cu predominanţa polimorfonuclearelor neutrofile, devine în zilele următoare limfomonocitară, cu scăderea pleiocitozei. Revenirea la normal a citologiei lichidului se face în 3—4 săptămîni.

Meningitele leptospirotice se însoţesc de lichid uşor opalescent şi o pleiocitoză ridicată, pînă la 1 300 de elemente/mm³. La început în formula citologică predomină polimorfonuclearele, apoi din ziua 10—12 devine aproape exclusiv limfocitară.

O pleiocitoză uşoară sau moderată cu 5—50 de elemente celulare/mm³, reprezentate predominant de polimorfonuclearele neutrofile, se întîlneşte constant în reacţiile meningiene din tifosul exantematic. Reacţii meningiene cu pleiocitoză de tip limfocitar se pot întîlni şi în insolaţii, boala serului, intoleranţe medicamentoase, în ascaridioză şi în traumatismele craniene.

Injecţiile de aer în ventriculii laterali sau în spaţiile subarahnoidiene vertebrale, care se practică în vederea diagnosticului radiologic şi radiografic al tumorilor, pot determina reacţii meningiene aseptice cu o pleiocitoză moderată sau accentuată (50—200 de elemente/mm³), cu predominanţa limfocitară în formula citologică.

În cazurile de meningite cu lichid clar, în care formula citologică este caracterizată printr-o polimorfonucleoză exclusivă, este totdeauna vorba de o formă acută, cum se întîlneşte de pildă la începutul poliomielitei, al leptospirozelor sau chiar într-o meningită meningococică în primele 24—48 de ore.

Cîteodată în reacţiile meningiene cu lichid clar se pot întîlni în formula citologică printre mononucleare şi polimorfonucleare, rare sau numeroase celule de talie mare, greu colorabile, cu protoplasma vacuolară cu nucleu palid rotunjit sau neregulat, cîteodată în kariokineză. Sînt celule tumorale care indică prezenţa unui cancer al nevraxului sau al meningelor.

TABELUL 139

Tabel sinoptic reprezentind rezultatele examenelor citologice, bacteriologice şi imunologice ale lichidului cefalorahidian în infecţii

	Lichid normal	Congestie meningeană simplă	Meningită acută	Meningită tuberculoasă	Meningită luetică	Encefalite şi mielite	Poliomielită
Examen citologic	0—2 limfocite /mm³	3—150/mm³ variabil	250 pînă la mai multe mii pe mm³. Predomină polimorfonuclearele	30—300/mm³ Predomină limfocitele	3—150/mm³ variabil mononucleoză cu limfocitză	Variabil	100—600/mm³ la începutul infecţiei, apoi revine la normal
Examen bacterioloic şi imunologic	—	—	Meningococ, pneumococ, stafilococ, streptococ. *Klebsiella, H. influenzae, Proteus,* B. tific, Colibacil etc.	Bacili Koch	Absenţa microbilor R.B.-W., R. citocol, Meinicke pozitive	Rar pozitiv	—

Există, de asemenea, posibilitatea de a găsi uneori în lichid, aproape exclusiv pneumococi sau meningococi fără reacție celulară. Este vorba de forme clinice de septicemie cu evoluție supraacută, în care meningele au fost invadate fără a avea timpul să mai reacționeze. Pe frotiuri se găsesc microbi așa de numeroși, încît creează impresia că s-a efectuat frotiul dintr-o cultură pură.

2. *Lichide opalescente*

Aspectul opalescent sau ușor tulbure al unui lichid cefalorahidian cu o pleiocitoză moderată (50—100 de elemente) și cu o formulă în care predomină polimorfonuclearele neutrofile constituie o indicație de meningită microbiană acută, în faza incipientă. Alteori un lichid opalescent cu pleiocitoză intensă și cu o formulă mixtă, în care predomină limfocitele, poate indica o meningită aseptică sau o meningită sifilitică.

3. *Lichide purulente*

În majoritatea cazurilor sînt datorite infecțiilor microbiene acute ale meningelor cu meningococi, pneumococi, streptococi etc. Centrifugarea lichidului nu este necesară. Frotiurile directe din lichid colorate cu Gram, albastru de metilen și Giemsa, precum și numărătoarea efectuată cu lichid diluat indică prezența masivă a agentului etiologic și o pleocitoză intensă (de peste 1 000 de elemente/mm^3), cu o formulă citologică cu predominanța aproape exclusivă a polimorfonuclearelor neutrofile.

4. *Lichide hemoragice*

Prezența sîngelui în lichid indică existența unei hemoragii meningiene, datorită fie traumatismelor (fractură a bazei craniului), fie hipertensiunii sau arteritei sifilitice.

Lichidul hemoragic centrifugat devine limpede galben sau galben roșcat, în funcție de intensitatea hemolizei. În sediment vom găsi numeroase hematii, polimorfonucleare, mononucleare și celule endoteliale. Unele endotelii se comportă ca macrofage și putem întîlni hematii fagocitate de aceste macrofage. În momentul cînd apar polimorfonuclearele eozinofile și limfocitele ca elemente predominante în formulă, ele reprezintă un indiciu de vindecare.

Uneori, este posibilă asociația hemoragiilor meningeniene cu meningită meningococică, pneumococică, cărbunoasă, fie cu meningită tuberculoasă.

5. *Lichide xantocrome*

În cazurile de hemoragie meningiană, cînd extragerea lichidului prin puncție se face după o săptămînă de la apariția hemoragiei, sedimentul nu mai conține decît un număr redus de hematii, dar lichidul continuă să mai păstreze cîtva timp culoarea galbenă anormală.

De asemenea, în cazurile de tifos exantematic cu erupție hemoragică cutanată intensă, lichidul cefalorahidian poate fi colorat în nuanțe variate de galben. În cazurile de tumori meningiene, cancer al nevraxului etc., datorită tulburărilor circulatoare prin compresiune, serul sanguin difuzează prin filtrație în lichid și-l colorează în variate nuanțe xantocromice.

Examenul bacteriologic de orientare. Pentru examenul bacteriologic de orientare este necesar să efectuăm frotiuri, însămînțări pe medii de cultură și inoculări la animale. Atît în însămînțări, cît și la inoculări, inoculul de lichid trebuie să fie mai mare decît în cazul produselor obișnuite, adică minimum 0,5—1 ml, în loc de 1—2 picături cum se procedează de obicei.

Flora bacteriană mai frecvent întîlnită în lichidul cefalorahidian, în afară de bacilul tuberculos — de a cărui prezență posibilă trebuie să ținem seama întotdeauna —, flora grampozitivă este alcătuită din stafilococi, pneumococi, streptococi, *Gaffkya tetragena*, *Listeria monocytogenes*, *Actinomyces*. Flora gramnegativă este reprezentată, în ordinea frecvenței, de *Neisseria intracelullaris*, neisserii pigmentate, *H. influenzae*, b. piocianic, *E. coli*, b. tific, leptospire și treponeme.

Examenul bacteriologic de orientare începe totdeauna cu efectuarea a 3 frotiuri din sedimentul lichidului, care se colorează cu Gram, Giemsa sau albastru de metilen și Ziehl-Neelsen. Însămînțările și inoculările se fac în funcție de datele clinice confirmate sau nu prin frotiuri.

Streptococii hemolitici apar în sediment sub formă de coci rotunzi, gram-pozitivi, așezați izolat, în perechi sau lanțuri scurte. Deseori seamănă foarte mult cu stafilococii și numai prin cultură putem face diferențierea. Stafilococii apar sub formă de coci rotunzi, grampozitivi izolați, în perechi sau în grămezi de 3—4 microbi. Pneumococii apar sub forma lor caracteristică de coci mari lanceolaţi, grampozitivi, destul de des pot prezenta şi o capsulă care apare ca un halo clar în jurul corpului microbian. *Haemophilus influenzae* este, în general, greu de recunoscut în frotiu, apare sub forma de cocobacili subţiri, gram-negativ, ascuns printre resturi celulare şi celule intacte. *Listeria monocitogenes* se întîlneşte destul de rar în lichid şi apare sub formă de bacili scurţi, gram-pozitivi şi pot fi confundaţi cu bacilii difterimorfi. Meningococul apare sub forma caracteristică de coc, ovalar, reniform aşezat în „diplo'' şi perechi de diplo intracelular în leucocitele polimorfonucleare neutrofile şi, de asemenea, extracelular.

Prezenţa diplococilor gram-negativi, intracelulari constituie un aspect patognomonic pentru meningita cerebrospinală meningococică. Însămînţările şi inoculările lichidului se fac ţinînd seama, în general, de faptul că meningitele acute primare sînt obişnuit date de meningococ, streptococ, pneumococ sau *H. influenzae*, iar meningitele acute secundare reprezintă o complicaţie a unei otite medii, mastoidite sau sinuzită datorită streptococului, pneumococului *H. influenzae*, stafilococului sau asocierii lor. În cazurile cînd se suspectează o meningită sifilitică, se practică inocularea intratesticulară la iepure a 1—3 ml de lichid cefalorahidian imediat după recoltarea lui. Atunci cînd se suspectează o meningită tuberculoasă, indiferent dacă frotiurile directe colorate cu Ziehl-Neelsen au decelat sau nu prezenţa bacililor acido-rezistenţi, se inoculează intraperitoneal 2 cobai cu cîte 2 ml lichid şi eventual, inoculări pe membrana corioalantoidiană a oului embrionat.

Identificarea tulpinii izolate, diagnosticul diferenţial cu alte specii patogene înrudite sau cu specii saprofite asemănătoare se continuă prin metodele speciale de diagnostic şi testarea sensibilităţii la antibiotice, caracteristice fiecărei infecţii în parte.

I. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL BILEI

Bila pentru examenele bacteriologice se recoltează obişnuit prin metoda tubajului duodenal; cu ajutorul unei sonde Einhorn sterilizată prin fierbere. În urma unei intervenţii chirurgicale pe căile biliare, bila poate fi recoltată prin aspiraţie din vezicula biliară sau prin ablaţia chirurgicală a veziculei.

Flora bacteriană, care poate fi întîlnită în infecţiile căilor biliare şi ale veziculei, este constituită de : stafilococi, streptococi, *Gaffkya tetragena*, b. pseudodifteric, *B. subtilis* ca floră gram-pozitivă şi *E. coli*, *S. typhi*, b. paratific, b. piocianic, *Proteus* şi *Klebsiella* dintre bacteriile gram-negative.

Examenul bacteriologic de orientare se realizează prin centrifugarea bilei şi efectuarea din sediment a 2 frotiuri care se colorează cu Gram şi albastru de metilen. Însămînţări se fac în bulion glucozat şi în 2 plăci cu geloză-sînge. Incubarea se face la 37°, obişnuit în aerobioză, dar este bine ca una dintre plăci s-o incubăm microaerofil, iar însămînţarea să se facă în profunzimea gelozei.

După 24 de ore se controlează macroscopic, cu lupa, coloniile crescute şi microscopic prin frotiu colorat Gram. Din coloniile izolate se fac subculturi pentru obţinerea culturii pure şi se continuă investigaţiile prin testele de diferenţiere biochimice, serologice şi de patogenitate, precum şi prin testarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice a tulpinii izolate.

J. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL LEZIUNILOR MUCOASEI INTESTINALE ŞI AL CONŢINUTULUI INTESTINAL

Materiile fecale conţin foarte numeroase specii bacteriene, unele din flora comensală proprie a intestinului, altele reprezentînd o floră saprofită de tranzit de provenienţă alimentară şi altele patogene. Prezenţa florei patogene poate fi datorită unei infecţii în evoluţie, ce se manifestă printr-o simptomatologie clinică sau poate fi întîlnită la indivizii purtători de microbi.

Produsul patologic din leziunile ulcerative ale mucoasei intestinale, mai ales cele determinate de infecţiile cronice, pe rect şi sigmoid trebuie recoltat de specialist prin rectosigmoidoscopie. Se vor recolta fragmente mucopurulente din leziunile ulcerative ale mucoasei.

Flora patogenă ce se poate întîlni în conţinutul intestinal este foarte numeroasă. Cele mai frecvent întîlnite specii patogene grampozitive sînt stafilococii, streptococii (enterococii), pneumococii, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* şi alţi anaerobi, b. pseudodifteric, *B. subtilis*, *Lactobacillus acidofilus* etc.

Flora patogenă gram-negativă este reprezentată mai ales de *E. coli*, b. holerei, b. tific şi paratific, *Salmonella enteritidis Gärtner* şi alte salmonele, *Shigella dysenteriae* şi celelalte bacterii dizenterice, b. piocianic şi *Proteus vulgaris*, iar dintre bacilii acidorezistenţi, *Mycobacterium tuberculosis*.

Examenul bacteriologic de orientare prin frotiuri este justificat numai în cazul suspectării unei tuberculoze intestinale, cînd se pot examina frotiuri din conținutul intestinal, colorate Ziehl-Neelsen.

Pentru izolarea și identificarea enterobacteriilor patogene este necesar să folosim metode de însămînțare pe medii de îmbogățire, selective și diferențiale, precum și metode serologice și biochimice de identificare, descrise pe larg la capitolul infecțiilor cu enterobacteriacee.

K. EXAMENUL CITOLOGIC ȘI BACTERIOLOGIC AL LICHIDELOR PLEURALE, PERITONEALE, PERICARDICE, ARTICULARE ȘI ALE VAGINALEI TESTICULARE

După concepția clasică, lichidele seroaselor pot fi de origine inflamatoare — exsudate — și de origine mecanică — transsudate. Transsudatul este, în general, mai limpede, conține mai puțină fibrină și deci, coagulează mai lent decît exsudatul. În realitate, rareori găsim lichide ale seroaselor de natură exclusiv inflamatoare sau mecanică. În majoritatea cazurilor sînt interesate ambele mecanisme de producere a lichidului în seroase. Stabilirea proporției elementelor ce indică participarea celor 2 mecanisme este deosebit de utilă pentru precizarea caracterului predominant infecțios sau mecanic al unui lichid al seroaselor.

Caracteristicile fizico-chimice și citobacteriologice ale lichidelor seroaselor ne dau indicații utile pentru diagnosticul de orientare și uneori chiar elementele diagnosticului etiologic. Flora bacteriană a exsudatelor și transsudatelor este mai puțin variată decît cea a căilor respiratorii superioare, ea putînd fi reprezentată de următoarele specii gram-pozitive : stafilococi, streptococi, pneumococi, *Cl. perfringens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megatherium* și *b.* pseudodifteric. Speciile gram-negative ce se întîlnesc mai frecvent sînt *H. influenzae*, *E. coli*, *Neisseria catharralis*, B. piocianic, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* și *b.* tific. Bineînțeles, nu trebuie exclusă niciodată posibilitatea prezenței florei acidorezistente, reprezentată de *M. tuberculosis*.

Lichidele seroaselor, recoltate aseptic prin puncție, trebuie predate laboratorului cît mai curînd după recoltare, pentru a evita coagularea lor. În practică însă, adeseori aceste lichide ajung coagulate. În această situație se transferă conținutul tubului de recoltă într-un flacon steril cu perle de sticlă și se agită cîteva minute pentru a desface coagulul și a elibera celulele lichidului.

Rezultatele citologice și bacteriologice sînt puțin influențate prin acest procedeu, cu condiția respectării asepsiei.

1. *Examenul citologic*

Lichidul seroaselor recoltat se repartizează în 2 tuburi de centrifugă conice, sterile, cîte 8—10 ml în fiecare și se centrifughează timp de 10 minute, la 600—800 de turații pe minut, pentru a nu altera celulele.

După centrifugare, lichidul supernatant se îndepărtează, fie cu o pipetă sterilă, fie prin înclinarea laterală lentă a tubului de centrifugă. Din sedimentul primului tub efectuăm preparatele necesare examenului citologic și bacteriologic, iar pe cel de-al doilea îl păstrăm pentru însămînțări și inoculări.

Pentru examenul citobacterian, efectuăm cu ajutorul unei pipete Pasteur fin efilate, 4 frotiuri în strat subțire pe lame noi curate și degresate. Frotiurile le introducem la termostatul de 37° și le lăsăm să se usuce spontan. După uscare le fixăm prin flambare și le colorăm unul Gram, celălalt cu metoda Ziehl-Neelsen. Celelalte 2 frotiuri le fixăm cu alcool metilic, timp de 10 minute și le colorăm apoi unul cu albastru de metilen sau toluidină, iar al doilea cu colorația Giemsa.

Examinînd la microscop frotiurile colorate Gram și Ziehl, ne dăm seama de prezența sau absența în lichid a florei bacteriene ce se colorează cu Gram sau a bacteriilor acidorezistente. Cercetînd frotiurile colorate cu Giemsa și albastru, decelăm varietățile de celule și proporția lor în lichidul seroasei.

În lichidul seroaselor pot fi întîlnite următoarele varietăți de celule :

a) *Hematii*. Ele pot fi de formă și dimensiuni normale sau ușor deformate și crenelate. Se colorează în verzui cu albastru și în roz cu Giemsa.

b) *Granulocite polimorfonucleare neutrofile*. Normale sau alterate, uneori în citoliză avansată în cazul exsudatelor purulente. În acest caz se văd numai umbrele nucleilor. Sînt mai mari ca hematiile (10—12 diametru), cu nucleul lobat care se colorează albastru-violet. Protoplasma este incoloră sau ușor rozată și conține granulații pulverulente neutrofile, care se colorează mov cu Giemsa.

c) *Granulocite eozinofile*, cu nucleul mai mare, nelobat și cu granulații acidofile mari ca icrele de Manciuria, care însă nu se colorează decît cu Giemsa.

d) *Leucocitele mononucleare. Monocite*, celule mari de 15—25 μ, cu nucleul rotunjit și ușor lobat, care se colorează violet și protoplasma gris-roz cu granulații azurofile. *Limfocitele*, celule mici, de mărimea hematiilor, cu nucleul rotund, ocupînd toată celula și cu o protoplasmă ca o bandă subțire la periferia nucleului.

e) *Celule endoteliale*. Sînt tipul de celule caracteristice lichidelor seroase. Sînt prezente în orice lichid al seroaselor, izolate sau în placarde. Sînt celule mari de formă poligonală cu protoplasma roz-pal și nucleul voluminos, rotunjit sau oval, se colorează mai puțin intens decît la celulele descrise mai sus.

Unele dintre tipurile celulare descrise se pot comporta ca celule fagocitare și vom întîlni granulocite neutrofile-*microfage*, cu microbi fagocitați în citoplasmă sau monocite și celule endoteliale-*macrofage* cu resturi celulare, hematii și microbi fagocitați în citoplasmă.

După predominanța procentuală a diferitelor tipuri de celule descrise mai sus, putem să ne orientăm asupra stadiului evolutiv al infecției la nivelul seroasei respective.

Pe frotiul colorat cu Giemsa se numără la microscop 200—300 de celule și se face repartiția procentuală a tipurilor celulare cu menționarea tipurilor de fagocite și cu excepția hematiilor, care nu se iau în considerare întrucît nu intervin activ în procesul inflamator și se stabilește astfel formula citologică a lichidului. Pe baza formulei citologice se pot recunoaște următoarele stadii ale procesului infecțios la nivelul seroasei :

— Procesul infecțios cu *evoluție acută* se caracterizează prin predominanța granulocitelor polimorfonucleare neutrofile, intacte sau ușor alterate, care exercită aproape exclusiv fagocitoza.

— Procesul infecțios cu *evoluție subacută* se traduce printr-un amestec în proporții apropiate de granulocite polimorfonucleare neutrofile, monocite și limfocite. Fagocitoza este efectuată, atît de microfage, cît și de macrofage. Putem întîlni și aspecte particulare de macrofage ca, de exemplu, microfage cu microbi fagocitați, înglobate în întregime într-un macrofag.

—Procesul infecțios cu *evoluție cronică* se recunoaște ușor prin predominanța masivă în exsudat a limfocitelor.

În procesele de natură predominant mecanică, citologia transsudatului se caracterizează prin prezența, în număr mare, a celulelor endoteliale de descuamare și în număr redus și cu morfologia intactă a celorlalte elemente celulare.

În procesele de natură tumorală, în lichidul seroaselor, apar celule neoplazice, care se caracterizează prin dimensiuni celulare neobișnuit de mari, de 5—10 ori mai mari decît leucocitele, cu nuclei deseori multipli, în cariokineză cu vacuole. În protoplasma celulelor neoplazice se întîlnesc incluzii și vacuole.

L. EXAMENUL CITOLOGIC AL REVĂRSATELOR LICHIDIENE

Lichidul extras aseptic prin puncția exploratoare poate avea un aspect gălbui-citrin, seros sau serofibrinos ; rozat sau roșu, hemoragic ; tulbure, seropurulent sau purulent ; lactescent, chiliform sau limpede, incolor.

1. *Lichidele serofibrinoase*

Sînt de obicei de culoare citrină și cîteodată ușor roz, datorită prezenței sîngelui. Lăsate pe masa de lucru într-un recipient, ele coagulează, formează un coagul de fibrină, iar lichidul supernatant se clarifică. Examenele chimice prin proba Rivalta și determinarea conținutului în fibrină ne dau indicații asupra naturii lichidului pleural.

De obicei lichidele pleureziilor tuberculoase primitive conțin cantități mari de fibrină, iar cele din tuberculozele secundare mai puțină.

Examenul microscopic al sedimentului lichidului pleural serofibrinos, efectuat după tehnica menționată mai sus, ne îngăduie să stabilim următoarele formule citologice :

a) Polimorfonucleată predominantă sau exclusivă, care se întîlnește în pleureziile cu evoluție acută, ca de pildă, cele secundare pneumopatiilor acute ; pleureziile acute strepto-, stafilosau pneumococice au aceeași formulă citologică. La început granulocitele polimorfonucleare sînt relativ intacte, apoi celulele se alterează și degenerează pe măsura evoluției purulente a lichidului.

Formele citologice cu polimorfonucleată se întîlnesc și în piopneumotorax. Predominanța polimorfonuclearelor neutrofile este asociată cu prezenţa cîtorva celule endoteliale şi limfocite. Tendinţa spre evoluţia purulentă se poate bine observa pe frotiu, prin alterarea celulelor şi mai ales prin slaba colorabilitate a granulaţiilor neutrofile.

b) Mononuclează cu limfocitoză predominantă. Formula citologică cu limfocitoză predominantă este caracteristică pleureziei tuberculoase constituite. Însă, deoarece formula citologică nu indică niciodată cauza infecţiei, ci numai modul de reacţie a organismului, există posibilitatea ca formele citologice asemănătoare să se întîlnească şi în alte afecţiuni. Limfocitoza exclusivă sau predominantă poate fi întîlnită, în revărsările lichidiene care însoţesc un pneumotorax terapeutic şi uneori în tuberculoza pleurală asociată cu limfogranulomatoză.

O limfocitoză predominantă cu cîteva polimorfonucleare şi celule endoteliale se întîlneşte şi în revărsările lichidiene pericardice, atunci cînd la elementul mecanic se adaugă şi cel inflamator.

c) Predominanţa celulelor endoteliale în formula citologică este caracteristică lichidelor de transsudat. Aşa de pildă, în hidrotoraxul cardiacilor sau în cazul compresiunii vaselor mari toracice prin tumori, găsim exclusiv celule endoteliale izolate sau grupate în placarde de 2, 4, 8 sau mai multe elemente celulare. De îndată ce survine elementul inflamator, în mecanismul de apariţie a revărsatului lichidian, încep să apară în formulă limfocitele şi polimorfonucleare. Prezenţa florei bacteriene în lichid, cu excepţia bacilului tuberculos, se traduce totdeauna printr-o creştere masivă a polimorfonuclearelor şi limfocitelor în formulă.

d) Formule citologice excepţionale sînt reprezentate de prezenţa în frotiuri a celulelor polimorfonucleare eozinofile, care pot fi întîlnite cu caracter temporar la începutul pleureziilor tuberculoase, în anumite cardiopatii de natură sifilitică. Polimorfonuclearele eozinofile pot apărea în număr mare în formulă şi în faza de resorbţie a revărsatelor lichidiene şi în acest caz reprezintă un indiciu de convalescenţă.

Celule leucemice de tip mieloid sau limfoid pot apare în cazurile de leucemie. Celule tumorale, caracteristice prin dimensiunile lor enorme de 10–20 ori diametrul unui leucocit cu nuclei multipli, giganţi în cariokineză cu incluzii şi vacuole în citoplasmă se întîlnesc în cancerul pulmonar.

2. *Lichidele hemoragice*

Lichidele pleurale sau cardiace pot conţine cantităţi variate de hematii. Pentru a putea fi observat macroscopic caracterul hemoragic al lichidului, el trebuie să conţină minimum 5 000 de hematii pe mm^3, sub acest conţinut lichidul păstrîndu-şi aspectul citrin.

Prezenţa hematiilor în cantităţi mari, alături de elementele obişnuite ale formulei citologice, indică o înrăutăţire clinică şi un element indicator al etiologiei tuberculoase sau canceroase.

În cazurile de hemotorax există, la început, o reacţie citologică predominant polimorfonucleară neutrofilă, apoi polinucleaza cedează treptat mononuclearelor care se transformă în reacţie limfocitară. Apariţia într-un lichid hemoragic aseptic a reacţiei citologice eozinofile reprezintă o indicaţie de prognostic favorabil. Dimpotrivă, apariţia polimorfonuclearelor neutrofile care devin din ce în ce mai abundente şi se însoţesc şi de prezenţa cocilor piogeni, *Klebsiella*, piocianic, *B. funduliformis* sau *Cl. perfringens* şi de degenerescenţa şi distrugerea celulelor indică o infecţie supraadăugată şi o evoluţie clinică spre piopneumotorax, pleurezie purulentă, pleurezie gangrenoasă etc.

3. *Lichidele purulente*

Lichidele purulente le întîlnim mai ales în pleureziile acute bacteriene. Flora este alcătuită, fie din coci piogeni, fie din bacterii gram-negative. Lichidul poate avea un miros fetid, care se datoreşte florei de asociaţie anaerobe. Există posibilitatea însă ca unele lichide cu predominanţă exclusivă a polimorfonuclearelor şi aspect macroscopic purulent să fie lichide aseptice fără prea mare gravitate clinică şi care se resorb repede. Acest fel de lichide le putem diferenţia de cele cu adevărat purulente prin aspectul celulelor polimorfonucleare neutrofile care sînt intacte şi cu granulocitele perfect colorabile, spre deosebire de cele din infecţiile purulente care au tendinţa la degenerescenţă şi ale căror granulaţii se colorează cu dificultate sau de loc.

Pleureziile cronice conţin polimorfonucleare foarte alterate, transformate în globule de puroi şi se însoţesc de numeroase granulaţii lipoidice. Majoritatea acestor pleurezii cronice sînt în realitate pleurezii tuberculoase, care s-au infectat secundar.

4. *Lichidele chiliforme și lichidele limpezi*

Lichidele pleureziilor chiliforme conțin numeroase granule de grăsime și cristale de colesterină. Examenul citologic al sedimentului colorat cu Giemsa ne arată prezența a numeroase celule endoteliale încărcate cu granulații lipidice, prezența moderată a limfocitelor și monocitelor, rare polimorfonucleare neutrofile. Extrem de rar se poate ca lichidul extras prin puncție să fie limpede, incolor sau ușor opalescent; este aproape sigur în acest caz că lichidul provine de la un chist hidatic al pleurei sau plămînului. În sedimentul după centrifugare se pot decela scolexul sau croșetele larvei hexacante a teniei echinococus.

5. *Lichidele seroasei testiculare și articulare*

Seroasa vaginalei testiculului se puncționează în cazurile de hidrocel. Formulele citologice ale lichidului din hidrocel se aseamănă, în general, cu acelea ale lichidului seroaselor. În cazurile de hidrocel cu etiologie tuberculoasă și sifilitică, în formula citologică predomină limfocitele; uneori găsim și numeroase celule endoteliale și spermatozoizi.

Orhitele acute, de obicei blenoragice, bruceloase, tifoidice sau virotice (oreillon), prezintă o formulă citologică alcătuită dintr-un număr mare de polimorfonucleare neutrofile și în special mononucleare. În artritele acute lichidul este bogat în polimorfonucleare neutrofile, fibrină și se coagulează rapid. Artritele tuberculoase sau tabetice au o formulă mixtă cu predominanța limfocitelor.

Examenul bacteriologic de orientare. Examenul microscopic al frotiurilor directe din sediment are, în general, scopul de a decela prezența sau absența florei bacteriene. În cazul lichidelor purulente examenul direct poate preciza prezența pneumococilor, care se pot recunoaște după forma lor caracteristică de diplococi lanceolați și prezența capsulei. Adeseori însă este imposibil să diferențiem numai prin examen microscopic direct pneumococii de streptococi.

Examenul bacteriologic de orientare se continuă prin însămînțare pe mediile uzuale de cultură, bulion glucozat și plăci cu geloză-sînge și prin inoculări la animalele de laborator sensibile. În general însămînțările trebuie să țină seama de datele clinice și de rezultatele examenului microscopic direct. De asemenea, trebuie să avem în vedere posibilitatea continuu prezentă a unei infecții tuberculoase. În practică este bine să însămînțăm sedimentul lichidului de cercetat în medii cu geloză-sînge, atît la suprafața mediului, cît și în profunzime și pe 6 tuburi cu mediul Löwenstein. În situația că lichidul de cercetat este serofibrinos, va trebui să fim foarte exigenți din punctul de vedere al posibilității prezenței bacililor Koch. În practica diagnosticului de laborator se întîlnesc situații cînd un lichid dintr-o pleurezie serofibrinoasă, care conține streptococi sau stafilococi, este în realitate de natură tuberculoasă. Atenție deci, la infecțiile supraadăugate care ne pot induce în eroare asupra etiologiei reale tuberculoase a unui lichid al seroaselor. De aceea, în cazul lichidelor serofibrinoase este imperios necesară și inocularea la 2 cobai. În funcție de examenul bacteriologic de orientare se vor putea efectua inoculări la șoarece pentru pneumococ și *Klebsiella*; de asemenea, la iepure pentru streptococ și stafilococ etc.

Inocularea lichidelor la animalele de laborator se face diferit dacă este vorba de un lichid purulent sau un lichid limpede. Lichidele purulente se inoculează subcutan în cantitate de 1—2 ml dintr-o suspensie a sedimentului în soluție clorurosodică 8,5‰ sterilă. Lichidele cu aspect serofibrinos fără floră bacteriană se injectează intraperitoneal în cantitate de 5—10 ml la cobai.

Identificarea speciei bacteriene izolate prin culturi sau inoculări la animal, ca și diagnosticul diferențial cu speciile patogene înrudite sau saprofite din flora de asociație se fac prin folosirea metodelor speciale de diagnostic bacteriologic descris la fiecare specie bacteriană în parte.

M. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL URINII

Pentru a putea decela prezența florei bacteriene în urină este obligatorie recoltarea urinii în condiții de asepsie. În mod obișnuit, urina conține floră de contaminare accidentală reprezentată de stafilococi, colibacili și alte bacterii intestinale; de aceea prezența bacteriilor în sedimentele obișnuite de urină nu are o valoare practică deosebită. Prezența leucocitelor în număr mare concomitentă cu aceea a bacteriilor indică o bacteriurie reală.

De aceea, este obligatoriu ca pentru examenul bacteriologic să efectuăm recoltarea prin sondaj cu ajutorul unei sonde sterile din sticlă sau metalică, la femeie. La bărbat se va evita sondarea datorită riscului de a infecta uretra şi vezica prin manevrele de introducerea sondei. Se preferă dezinfectarea meatului şi îndepărtarea primului jet de urină care spală uretra; apoi, se recoltează cantitatea de 15—20 ml într-un vas steril. La copii, unde dificultăţile sînt şi mai mari, vom folosi aceleaşi precauţiuni cu şanse mai mici însă, de a obţine urină necontaminată. În cazuri speciale, specialistul urolog poate recolta, prin cateterism ureteral, urină, separat din bazinetele renale, pentru precizarea sediului focarelor de infecţie.

Datorită acestor dificultăţi, cu unele excepţii ale recoltării la femeie, urina se contaminează cu prilejul recoltării şi din punct de vedere practic, trebuie să efectuăm însămînţările bacteriologice cît mai curînd posibil după recoltare, pentru ca eventuala floră de contaminare să nu aibă timp să se înmulţească. Administrarea de antiseptice urinare sau antibiotice este bine să fie suspendată, dacă se poate. În cazul administrării unui tratament sulfamidat vom adăuga în mediul lichid acid paraaminobenzoic, în proporţie de 5 mg la 100 ml mediu.

Pentru însămînţarea urinii, se recoltează cu o pipetă Pasteur sterilă de circa 1 ml din urina recoltată aseptic şi se însămînţează direct 3—4 picături pe suprafaţa unei plăci cu geloză, sînge, care se diseminează în striuri paralele cu ansa bacteriologică, iar restul se însămînţează într-un tub cu bulion glucozat. Se centrifughează apoi 10 ml de urină şi din sediment se însămînţează pe o placă cu geloză-sînge şi în bulion glucozat. Eventual se pot face însămînţări simultane pe anumite medii selective, cum este, de pildă, mediul Drigalski pentru decelarea *E. coli.* Apoi se efectuează din sediment şi frotiuri directe care se colorează cu Gram. Prezenţa bacteriilor în frotiul din sediment, reprezintă o indicaţie mai ales în cazul florei monomicrobiene. În orice caz, frotiurile de orientare din sediment trebuie confirmate prin culturile din sedimentul urinar. Culturile se incubează la 37° şi după 24 de ore sînt controlate pentru apariţia turbidităţii în mediul lichid şi a coloniilor izolate pe geloza-sînge. Se efectuează frotiuri colorate cu Gram şi subcultură din colonii izolate pentru obţinerea culturii pure. Tulpina izolată în cultură pură se identifică prin studiul caracterelor morfologice, de cultură, biochimice, antigenice şi de patogenitate.

Urocultura în mediu lichid nu-şi justifică prea mult necesitatea, pentru că pe mediile solide se obţin direct coloniile izolate. Unele laboratoare renunţă de la bun început la urocultură în mediu lichid. Este mai prudent însă să folosim şi un mediu lichid, pentru că, pe de o parte inoculul poate fi mai mare, deci şansele de a decela bacteriile cresc, iar pe de altă parte toate bacteriile mobile se dezvoltă cu mai mare uşurinţă într-un mediu lichid. Pentru a păstra, aşadar, intacte toate şansele de decelare a bacteriilor în urină este util să asociem mediilor solide şi un mediu lichid.

În cazul examenului urinii pentru decelarea bacililor tuberculoşi recoltarea aseptică a urinii. nu este necesară decît în cazuri speciale. Recoltarea emiterilor din 24 de ore, se face obişnuit într-un vas curat. Urina din 24 de ore se amestecă şi se centrifughează cel puţin o cantitate de 100 ml de urină, sedimentele se notează, se amestecă şi se tratează cu acid sulfuric pentru distrugerea florei de asociaţie neacidorezistentă, apoi se neutralizează cu NaOH în prezenţa turnesolului pînă la apariţia culorii violet ametist, se centrifughează, se pipetează şi se aruncă supernatantul, iar sedimentul se suspendă în 3—5 ml de soluţie clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$ sterilă. Această suspensie se însămînţează pe 6—8 tuburi Loewenstein, 4 tuburi geloză înclinată simplă şi se inoculează la 2 cobai sub pielea coapsei, apoi din restul de sediment se efectuează 2 frotiuri colorate cu Ziehl-Neelsen. Prezenţa bacililor acidorezistenţi în frotiu trebuie interpretată cu prudenţă, datorită posibilităţii de confuzie cu bacilii acidorezistenţi saprofiţi şi în special cu *Mycobacterium smegmatis*, saprofit al mucoaselor genitale. Numai culturile şi infectarea experimentală a cobaiului sînt edificatoare. Flora bacteriană ce poate fi întîlnită în urina recoltată aseptic este reprezentată de următoarele specii gramnegative: *E. coli*, *Klebsiella*, b. *Proteus*, *N. catharrhalis*, b. piocianic, *S. typhi*, S. *paratyphi*, *Shigella* şi *Brucella*. Flora gram-pozitivă este mai restrînsă şi se întîlnesc de obicei stafilococi, streptococi şi b. pseudodifteric Hoffmann. Flora acidorezistentă poate fi reprezentată de bacilii acidorezistenţi nepatogeni ca *M. smegmatis*, dar şi de *Mycobacterium tuberculosis*.

N. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL SÎNGELUI

Bacteriile se întîlnesc în sînge, în infecţiile septicemice şi în bacteriemiile trecătoare. Numărul lor în sînge este în concordanţă cu evoluția clinică a infecției; bacteriile sînt mai numeroase în formele acute și supraacute, rare și extrem de rare în formele subacute și cronice. În bacteriemii, care se traduc prin prezența temporară a bacteriilor eliberate dintr-un focar latent de infecție în circulația generală, și care nu se însoțesc de manifestări clinice, proporția bacteriilor în sînge este, de asemenea, scăzută.

În general însă, dacă luăm în considerație proporția bacteriilor la volumul total al sîngelui circulant, numărul lor este redus. Aceasta face ca în frotiurile directe din sînge să nu putem decela prezența lor decît excepțional și deci, să apară obligatorie crearea unor condiții care să favorizeze multiplicarea activă a bacteriilor, pentru a deveni posibilă decelarea prezenței lor.

Deci, metoda cea mai sigură de evidențiere a prezenței bacteriilor în sînge este cultivarea, sîngelui cu eventual conținut de bacterii, pe mediile cele mai favorabile dezvoltării bacteriilor.

Acest lucru se realizează în practică, prin tehnica hemoculturii.

Hemocultura constituie un mijloc de diagnostic care prezintă cîteva avantaje majore pentru diagnosticul unei boli infecțioase. În primul rînd, ea oferă posibilitatea realizării unui diagnostic etiologic direct, datorită izolării și identificării microbului care a produs infecția. În unele infecții, ca acelea care se caracterizează prin prezența unei bacteriemii în faza incipientă a bolii, cum este cazul febrei tifoide și febrelor paratifoide și în infecțiile septicemice acute se creează posibilitatea realizării unui diagnostic etiologic precoce, care îngăduie luarea măsurilor terapeutice și antiepidemice cele mai eficace. În sfîrșit, un alt avantaj al hemoculturii constă în faptul că permițînd izolarea și identificarea tulpinii microbiene care a cauzat infecția se pot realiza repede toate premisele aplicării unui tratament antiinfecțios pe baze științifice, ca: testarea spectrului de sensibilitate la antibiotice și chimioterapice, efectuarea lizotipiei pentru stabilirea diagnosticului epidemiologic și obținerea unui autovaccin eficace, cînd necesitatea măsurilor de combatere și profilaxie le impun. În unele infecții cu evoluție lentă subacută și cronică, hemocultura rămîne deseori singura modalitate de realizare a unui diagnostic etiologic cert. Așa este, de pildă, cazul endocarditei bacteriene subacute și a unor forme clinice de bruceloză umană.

Datorită acestor avantaje, metoda diagnosticului prin hemocultură trebuie folosită totdeauna cu precădere în cazurile cînd indicațiile de ordin clinic și epidemiologic o recomandă.

Precauții pentru asigurarea eficacității maxime

În vederea obținerii rezultatelor maxime cu această valoroasă metodă de diagnostic este necesar să luăm cîteva precauții, fără de care eficacitatea metodei scade sau se înregistrează eșecuri.

Alegerea locului de recoltare a sîngelui are o mare importanță. Dacă în majoritatea cazurilor recoltarea sîngelui venos de la nivelul unei vene de la plica cotului este satisfăcătoare în infecțiile acute și cu bacteriemie în faza incipientă a bolii, în infecțiile cu evoluție lentă ca endocardita bacteriană sau bruceloza, este necesar să efectuăm recoltarea de sînge prin tehnica puncției arteriale din artera femorală sau a sîngelui sternal prin tehnica puncției sternale.

Într-o septicemie datorită unei tromboflebite, este mai avantajos să puncționăm o venă tributară teritoriului unde s-a localizat procesul infecțios. Nivelul de recoltare a sîngelui pentru hemocultură poate fi condiționat și de factorul vîrstă. De obicei, la copii peste 6 ani se poate aplica bine tehnica recoltării dintr-o venă de la plica cotului. La copii între 1 și 6 ani recoltarea sîngelui se face de preferință din vena jugulară externă sau dintr-o venă temporală; la copiii sub vîrsta de 1 an, din sinusul longitudinal superior prin fontanela anterioară.

Folosirea mediului de cultură cel mai favorabil microbului incriminat ca agent etiologic constituie, de asemenea, o precauție esențială pentru reușita hemoculturii. Deși mediile lichide sînt în principiu cele mai favorabile pentru realizarea hemoculturii, pentru că asigură posibilitatea însămînțării unei cantități mai mari de sînge, este necesar să nu scăpăm din vedere posibilitatea însămînțărilor în mediile cu cu geloză-sînge sau folosirea simultană a mediilor lichide și solide, ca în metoda Castaneda pentru izolarea brucelelor.

Cînd se bănuiește eventualitatea unei infecții cu bacterii anaerobe, ca de pildă prezența *B. funduliformis*, a streptococilor sau stafilococilor anaerobi se vor efectua și însămînțările necesare pe medii anaerobe. Incubarea în atmosferă cu adaos de CO_2, hotărîtoare pentru izolarea *Br. abortus bovis*, trebuie, de asemenea, reținută ca precauție esențială. Faptul că în mediul de hemocultură poate persista acțiunea alexinei și a altor factori bactericizi din sînge, poate constitui o cauză de eșec al diagnosticului prin hemocultură. Adaosul de liquoid în proporție de 0,05 la 10ml blochează acțiunea bactericidă a sîngelui și favorizează astfel dezvoltarea bacteriilor în cultură. Saponina în soluție 2% se adaugă în cantitate de 1 ml la 100 ml mediu, pentru a realiza blocarea funcției fagocitare a leucocitelor sîngelui. Este necesară, de asemenea, adăugarea a 1 ml filtrat de cultură de *Escherichia coli* și 5 mg acid paraaminobenzoic la 100 ml mediu de cultură, pentru neutralizarea efectului penicilinei sau sulfamidelor în cazul că s-a administrat bolnavului un astfel de tratament.

Recoltarea unei cantități de sînge corespunzătoare cu evoluția clinică a infecției reprezintă, de asemenea, o precauție importantă care, trecută cu vederea, poate deveni o cauză de eșec al diagnosticului prin hemocultură. În infecțiile septicemice acute și supraacute și în infecțiile cu bacteriemie în faza incipientă a bolii cantitatea de 8—10 ml de sînge este, în general, suficientă pentru decelarea prezenței bacteriilor în hemocultură. În cazurile de infecții cu evoluție subacută și cronică datorită numărului redus de bacterii în sînge, pe lîngă alegerea judicioasă a locului de recoltare a sîngelui, trebuie să luăm precauția de a recolta o cantitate cît mai mare de sînge, dar în orice caz minimum 20 ml pentru a avea șanse de a obține o hemocultură pozitivă.

Respectarea proporției între sîngele însămînțat și mediu reprezintă o precauție care completează pe aceea a cantității de sînge necesară pentru hemocultură. Proporția de 1 la 20 sau 1 la 30 reprezintă minimum necesar pentru asigurarea neutralizării efectului bactericid al sîngelui prin diluție, pe de o parte, și a condițiilor nutritive necesare dezvoltării optime bacteriene pe de altă parte.

Precauția de a alege momentul cel mai favorabil recoltării are, de asemenea, importanță mai ales în infecțiile septicemice acute, unde este preferabil să recoltăm sîngele în plină perioadă de pirexie în momentul febrei maxime, cînd numărul bacteriilor din circulația generală este maxim sau dacă este posibil chiar înaintea unui frison. Uneori este necesar să efectuăm 2 sau 3 recolte în aceeași zi, pentru a prinde momentul cel mai favorabil al prezenței bacteriilor în sînge.

Precauțiile de respectare a condițiilor de asepsie și sterilitate trebuie observate cu strictă rigurozitate. Prezența într-o hemocultură a stafilococului, a bacilului pseudodifteric, a colibacilului sau a *B. subtilis* trebuie interpretată cu prudență și în orice caz confirmată printr-o nouă hemocultură, deoarece trebuie să avem în vedere totdeauna posibilitatea, ca printr-o recoltare în condiții deficitare de asepsie și sterilitate, să se contamineze hemocultura cu flora de pe piele sau de pe instrumentele cu care am lucrat. Contaminarea unei hemoculturi se poate face și ulterior prin nerespectarea unei tehnici riguroase de lucru sterilă la efectuarea controalelor și subculturilor.

Alegerea metodei de efectuare a hemoculturii

Șansele de reușită a unui diagnostic prin hemocultură sînt condiționate de alegerea celei mai sensibile metode în funcție de infecția al cărei agent etiologic dorim să-l izolăm și de forma clinică și stadiul evolutiv al infecției. Așa, de pildă, folosirea arterioculturii are șanse mai mari de decelare a agentului etiologic în cazurile presupuse clinic ca endocardite bacteriene subacute; tot așa este cazul meduloculturii, care în unele forme clinice de bruceloză latentă, poate reprezenta singura modalitate practică de diagnostic etiologic prin decelarea brucelelor în sînge.

Uneori, în anumite forme clinice de infecție, în care șansele izolării microbilor prin hemocultură după tehnica obișnuită a însămînțării sîngelui integral în mediul de cultură sînt de la bun început minime, este util să folosim simultan și hemocultura cu coagul de sînge. Recoltarea sîngelui în cantitate de 20 ml se face după tehnica obișnuită a hemoculturii cu seringă Luer de la o venă din plica cotului și apoi repartizat steril cîte 10 ml în 2 tuburi sterile. Sîngele este așezat în stelaj și lăsat să coaguleze, apoi se introduce în frigider la +4° peste noapte. A doua zi dimineața serul este transvazat prin aspirație cu o pipetă sterilă cu care avem grijă să desprindem și cheagul de sînge de pe peretele tubului. Serul transvazat steril poate servi la eventuale determinări serologice. Coagulul de sînge se însămînțează prin răsturnarea tuburilor în cîte un balonaș cu 100 ml mediu lichid, a cărui compoziție este în funcție de microbul pe care dorim să-l izolăm. Hemoculturile din coagulul sanguin sînt incubate la 37° şi în condiţii de microaerofilie cu adaos de CO_2, dacă necesităţile o impun.

Urmărirea hemoculturii din coagulul sanguin se efectuează timp de minimum o lună cu subculturi la 5 zile interval. Pentru a mări şansele de decelare a diferiţilor agenţi infecţioşi în sînge se folosesc metode ajutătoare, care au drept scop scoaterea microbilor din sîngele visceral şi din variate focare de infecţie din organe şi aducerea lor în sîngele periferic. Folosirea vaccinului antibrucelos, cu recoltarea hemoculturii după 24 de ore constituie un astfel de exemplu. Utilizarea unui regim alimentar bogat în lipide este recomandat de către unii autori pentru a favoriza creşterea numărului de bacili tifici în sîngele periferic la bolnavii de febră tifoidă. Splenocontracţia, metodă mult folosită în urmă cu 15—20 de ani, deşi eficientă, este folosită în prezent cu deosebită prudenţă, deoarece s-a constatat că produce în acelaşi timp o agravare în evoluţia infecţiei prin determinarea de noi localizări infecţioase metastatice şi favorizează apariţia recăderilor.

Tehnica propriu-zisă de executare a recoltării şi însămînţării sîngelui influenţează, de asemenea, eficienţa diagnosticului prin hemocultură. Antiseptizarea riguroasă a pielii la locul de recoltă şi respectarea condiţiilor riguroase de sterilitate la însămînţarea sîngelui sînt deosebit de importante şi trebuie urmărite cu deosebită atenţie. O hemocultură pozitivă cu un microb patogen din flora de contaminare de pe piele sau din aer ne poate crea, uneori, dificultăţi mari datorită diagnosticului etiologic eronat. De aceea, este bine să evităm tehnica recoltării hemoculturii prin puncţie venoasă cu acul montat la o seringă Luer şi să preferăm folosirea tehnicii cu acul montat la un tub de cauciuc care comunică direct cu recipentul în care se află mediul de cultură. În felul acesta însămînţarea se face la adăpost de orice contaminare posibilă. Importantă pentru evitarea contaminării şi a eventualelor substituţii este închiderea etanşă a balonului de hemocultură, etichetarea sau notarea lui şi introducerea la termostat, cît mai repede după recoltare, pentru incubare în condiţiile cele mai favorabile.

Urmărirea ulterioară a unei hemoculturi

Recipientele însămînţate pentru hemocultură incubate la 37° în condiţiile corespunzătoare cerinţelor de aerobioză, microaerofilie sau anaerobioză caracteristice speciei microbiene pe care încercăm s-o izolăm din sînge, trebuie controlate zilnic şi urmărite un timp variabil a cărui limită medie este de 10—14 zile, iar ca maximum de aproximativ 30—45 de zile.

I. Controlul hemoculturii se efectuează, în primul rînd, prin *aspectul macroscopic al mediului lichid însămînţat.* O serie de indicaţii de orientare deosebit de utile pot fi apreciate de specialistul cu suficientă experienţă. De pildă, salmonelele tulbură uniform mediul; *E. coli* tulbură mediul şi formează uneori pe peretele balonaşului aproape de suprafaţa mediului un depozit inelar albicios; *B. subtilis* creşte repede în hemocultură cu formarea unei membrane caracteristice la suprafaţa mediului lichid; pneumococul şi streptococul viridans determină o turbiditate moderată mediului şi formează un depozit grunjos pe fundul balonului de cultură, iar uneori imprimă o coloraţie verzuie a depozitului de hematii, datorită efectelor de α-hemoliză; b. piocianic poate produce o înverzire cu fluorescenţă a mediului, datorită elaborării pigmenţilor caracteristici; stafilococul tulbură uniform bulionul şi constituie un depozit albicios pe fundul balonului de hemocultură; streptococul β-hemolitic nu tulbură bulionul şi se acumulează sub forma unor grunji fini pe pereţii şi în fundul balonului cu mediul lichid.

II. Controlul hemoculturii se efectuează, în al doilea rînd, prin *examenul microscopic direct al unui preparat* între lamă şi lamelă şi al unui preparat colorat cu Gram. Examenul între lamă şi lamelă ne permite să constatăm prezenţa formelor bacteriene mobile. Examenul frotiului colorat cu Gram ne indică prezenţa, forma şi tinctorialitatea bacteriilor ce s-au dezvoltat în hemocultură.

III. Controlul hemoculturii se efectuează, în al treilea rînd, prin *efectuarea de subculturi din mediul lichid pe medii uzuale şi speciale* cele mai favorabile speciei microbiene pe care urmărim s-o izolăm prin hemocultură. Ritmul efectuării subculturilor este indicat de forma clinică de evoluţie a infecţiei, în infecţiile septicemice acute şi supraacute, subculturile făcîndu-se zilnic pe geloză înclinată, pe suprafaţa unei plăci cu geloză-sînge şi în profunzimea unei plăci cu geloză-sînge. În cazul infecţiilor cu evoluţie subacută şi cronică, cum este de pildă, cazul endocarditei bacteriene subacute sau al infecţiei bruceloase, ritmul efectuării subculturilor se spaţiază la 3—5 zile. La efectuarea subculturilor se poate asocia, alături de geloza înclinată şi geloza-sînge, folosirea unor medii complexe speciale ca geloza-ficat, geloza glucozată TIEM etc.

Subculturile se urmăresc zilnic prin controlul macroscopic, cu lupa, pentru apariţia coloniilor izolate şi în continuare prin frotiuri colorate cu Gram şi subculturi, pentru obţinerea tulpinii izolate în cultură pură în vederea studiului caracteristicelor de specie şi a identificării. La efectuarea operaţiilor necesare realizării etapei a II-a şi a III-a a controlului unei hemoculturi este obligatorie respectarea unei sterilităţi riguroase în executarea tehnicilor bacteriologice.

Pentru aprecierea faptului că, tulpina microbiană izolată prin metoda hemoculturii este într-adevăr agentul etiologic al unei infecţii, este necesar să existe o concordanţă între identitatea microbului patogen şi simptomatologia clinică a bolnavului. Certitudinea fermă a izolării agentului etiologic al infecţiei prin hemocultură derivă însă numai din izolarea prin două sau mai multe hemoculturi a unei tulpini cu aceleaşi caracteristici.

Flora bacteriană întîlnită mai frecvent în hemoculturi

Metoda diagnosticului prin hemocultură poate pune în evidenţă prezenţa în circulaţia generală a unui important număr de specii bacteriene patogene. Flora gram-pozitivă este reprezentată de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* (în special enterococ şi *S. viridans*), *Pneumococcus*, *B. anthracis* şi anaerobi sporulaţi ca *Cl. perfringens*, *oedematiens*, *histolyticum* etc.

Flora gram-negativă mult mai numeroasă este reprezentată, în ordinea frecvenţei, de următoarele specii : *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A.*, *S. paratyphi B.* etc. *N. intracellularis meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *N. flava*, *N. flavescens* etc., *Brucella abortus bovis*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexnerii* etc., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas pyocianea*, *Proteus vulgaris*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella pestis* şi *P. tularensis*.

Flora anaerobă poate fi reprezentată în special de stafilococi şi streptococi anaerobi, de unii anaerobi telurici mai sus-citaţi şi de flora anaerobă netelurică, dintre care mai frecvent se întîlnesc speciile : *Spherophorus funduliformis* şi *Ramibacterium ramosum*.

Izolarea prin hemocultură a speciei *Staphylococcus* trebuie interpretată cu prudenţă şi în orice caz este necesară confirmarea prezenţei lui în 2 sau mai multe hemoculturi practicate la intervale diferite. Cînd se izolează specia *Staphylococcus albus* contaminarea este certă şi se impune repetarea hemoculturii. Prezenţa în hemoculturi a unor specii a *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mycoides* sau a corinebacteriilor nepatogene ca *C. Hoffmanni* sau *C. cutis commune* reprezintă o contaminare certă a hemoculturii, fie datorită condiţiilor nesatisfăcătoare de recoltă, fie din cauza nerespectării stricte a operaţiilor sterile în executarea controalelor ulterioare ale hemoculturii.

BIBLIOGRAFIE

BALŞ M., VOICULESCU M. — Examene curente de laborator, necesare medicului de spital, Ed. I.M.F., Bucureşti, 1951.

DUMAS J. — Bactériologie medicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 206—288.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 26—34.

KOLMER J. — Approved Laboratory Techniques, ed. a 4-a, Ed. Appleton-Century, New-York, 1945, p. 397—422.

KOLMER J. — Clinical diagnosis by laboratory examinations, ed. I, Ed. Appleton-Century, New-York, 1944, p. 348—430.

STITT R. E., CLOUGH N. P., BRANHAM E. SARA — Clinical and pathologic examinations of the various body fluids and organs. Practical Bacteriology, Hematology and Parasitology, ed. a 10-a, Ed. Blakiston, New-York, 1948, p. 731—885.

WHITBY L., HYNES M. — Medical Bacteriology, ed. a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 487—505.

DIAGNOSTICUL INFECŢIILOR CU COCI PATOGENI

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR STAFILOCOCICE

Familia : *Micrococcaceae*. Genul : *Staphylococcus*. Specia tip : *Staphylococcus aureus*.

Generalităţi

Stafilococii sînt agenţi cauzali ai unor variate stări patologice predominant de natură supurativă, care afectează diferite ţesuturi şi organe ale organismului. Sînt obişnuit agenţii etiologici ai furunculelor, furunculelor antracoide şi osteomielitei ; constituie flora de infecţie a plăgilor şi arsurilor şi pot fi agenţi infecţioşi primari sau în asociaţie cu alte microorganisme; pot fi întîlniţi de asemenea într-o serie de cazuri de pneumonie, meningită, septicemie, endocardită, pioartroză, conjunctivită, abcese renale şi alte colecţii purulente.

În ultimii ani, o dată cu apariţia antibioticelor, stafilococii au căpătat o importanţă deosebită în spitalele de chirurgie şi maternităţi, fiind răspunzători de apariţia izbucnirilor de *Pemphigus neonatorum*, numeroase cazuri de pneumonii la nou-născuţi şi mastite la mame. Stafilococii sînt de asemenea cauzatorii unor izbucniri de toxiinfecţii alimentare şi în ultimul timp au fost incriminaţi în etiologia enteritelor care survin după administrarea terapeutică a antibioticelor.

Stafilococii patogeni sînt obişnuit paraziţi şi se întîlnesc frecvent pe pielea şi mucoasa organismului, unde pot exista sub formă tranzitorie sau să facă parte din flora proprie a ţesutului. Stafilococii potenţial patogeni pot fi izolaţi prin cultură din rinofaringele indivizilor sănătoşi în proporţie de 50% şi în culturi de pe piele în proporţie de 20%. Stafilococii se pot găsi uneori în număr mare în mediul înconjurător, de exemplu, în praf, în aer sau pe obiectele uzuale; ei se găsesc deosebit de numeroşi în vecinătatea persoanelor infectate masiv; se poate aşadar presupune că prezenţa lor în mediul înconjurător este generată de prezenţa unei surse umane, purtătorul de stafilococ.

Stafilococii patogeni sînt reprezentaţi de cîteva specii limitate ale unui larg grup de micrococi cu distribuţie universală. Deşi majoritatea speciilor din grupul micrococilor sînt nepatogene, unele dintre ele prezintă asemănări apropiate cu stafilococii patogeni, atît din punct de vedere morfologic şi tinctorial, cît şi prin cultură. Unele din aceste specii nepatogene se întîlnesc pe pielea şi mucoasele organismului, făcînd chiar parte din flora permanentă a cavităţilor naturale ale organismului.

Din aceste considerente, în diagnosticul de laborator al infecţiei stafilococice, apare ca deosebit de important să putem diferenţia varietăţile patogene de cele nepatogene din mediul ambiant.

Caractere morfologice şi tinctoriale

La microscop, stafilococii apar ca celule sferice, aşezate izolat şi în grămezi neregulate. Acest mod de grupare apare mai ales în frotiurile colorate, preparate dintr-o cultură pe agar. În culturile în bulion grămezile de coci sînt mai caracteristice asemănîndu-se cu boabele unui ciorchine de strugure, de aci şi denumirea de „staphylo". Se întîlnesc adeseori şi coci izolaţi, în perechi sau în lanţuri scurte; lanţuri lungi nu se întîlnesc niciodată la stafilococi. Dimensiunile cocilor sînt de 0,8—1 μ diametru; în general tendinţa stafilococilor într-o cultură este de a fi uniformi ca diametru şi aşezare. În produsele patologice, datorită influenţei antibioticelor, uniformitatea de dimensiune şi aşezare este modificată. În culturile proaspete de 18—24 de ore cocii sînt gram-pozitivi.

Gruparea în grămezi nu este o caracteristică exclusivă a stafilococilor; ea poate fi întîlnită şi la alţi micrococi şi uneori la enterococi, cînd sînt cultivaţi pe medii solide. Stafilococii sînt microbi imobili, nu formează spori şi nici capsulă. Frotiurile din exsudatele purulente se pot colora, pe lîngă metoda Gram şi cu o coloraţie simplă cu albastru de metilen sau albastru de toluidină, pentru a putea observa mai bine citologia exsudatului şi relaţiile dintre microbi şi fagocitele micro- şi macrofage.

Caractere de cultură

Stafilococii cresc bine pe mediile uzuale şi pe aproape toate mediile de cultură bacteriologice în condiţii de aerobioză şi microaerofilie. Temperatura optimă de creştere este 37°. În mediile lichide creşterea se manifestă prin tulburarea uniformă a mediului şi depunerea pe fundul tubului de cultură. Pe mediile solide ca, de pildă, geloza, se dezvoltă sub formă de colonii rotunde, uşor bombate, de 1—2 mm

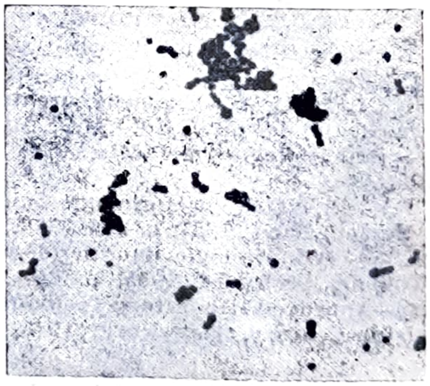


Fig. 288. — Staphylococcus aureus, frotiu dintr-o cultură în bulion (coloraţie Gram).

diametru, opace, lucioase, cu margini regulate de tip *smooth*. Creșterea se însoțește de secretarea unui pigment, care colorează coloniile cu nuanțe intermediare, de la auriu intens la galben ca lămîia și alb ca porțelanul. Pigmentogeneza este influențată de o serie de factori, printre care compoziția mediului și temperatura joacă un rol precumpănitor. Pigmentația apare pe mediile obișnuite după o incubare de 24 de ore la 37° ; ea se intensifică însă dacă păstrăm cultura la temperatura camerei încă 1—2 zile. Pigmentogeneza este evidențiată în condiții optime dacă însămînțăm tulpina de stafilococ pe un mediu constituit din geloză nutritivă cu adaos de 10% lapte. Proaspăt izolate din produsul patologic, majoritatea tulpinilor însămînțate pe agar-sînge dezvoltă o zonă netă de hemoliză în jurul coloniilor. Stafilococii produc cîteva hemolizine, dintre care două sînt mai importante : α- și β-hemolizina.

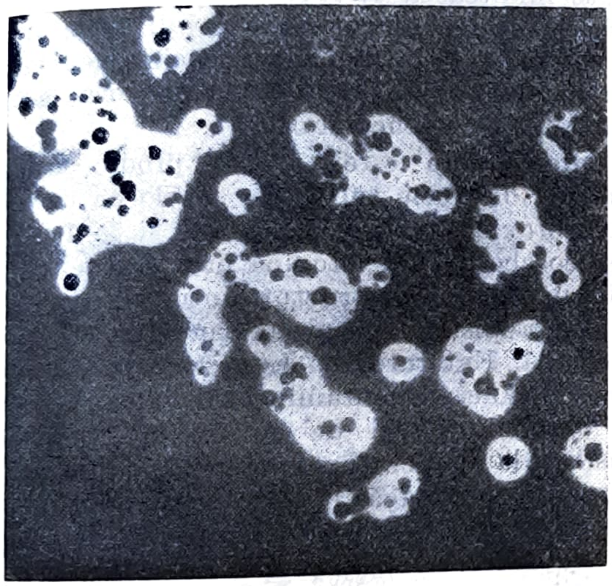


Fig. 289. — **Colonii de stafilococi patogeni cu zonă de hemoliză totală. Cultură de 24 de ore pe agar-sînge (colecția autorului).**

Hemolizina α este activă asupra eritrocitelor de iepure și oaie; hematiile umane sînt rezistente la acțiunea ei. Pe agar-sînge de iepure, α-hemolizina produce o zonă de hemoliză completă în jurul coloniilor, după o incubare de 18—24 de ore la 37°. Proaspăt izolate din produsul patologic, tulpinile de stafilococ care produc hemoliza eritrocitelor de iepure sînt considerate ca prezumtiv patogene.

Hemolizina β produce liza hematiilor de oaie, bou și om. Pe agar-sînge de oaie produce în jurul coloniei o zonă centrală mică de hemoliză clară, înconjurată de o zonă largă întunecată de hemoliză parțială caracteristică β-hemolizinei stafilococice. Acest aspect de β-hemoliză se accentuează prin păstrarea culturii peste noapte la ghețar și a fost denumit hemoliză de tip cald-rece. Acțiunea hemolitică de tip cald-rece a hemolizinei β-stafilococice se poate evidenția mai net prin amestecarea într-o eprubetă a unei suspensii de eritrocite de oaie cu o cantitate de filtrat de cultură de stafilococ. Hemoliza nu apare după incubarea de 24 de ore la 37°, dar devine evidentă după păstrarea peste noapte la ghețar sau la temperatura camerei. β-hemolizina este produsă în special de tulpinile de stafilococ de origine bovină.

Ambele hemolizine sînt elaborate de stafilococ în condiții optime, dacă incubarea culturilor se face în atmosferă cu conținut de 30% CO_2.

Majoritatea stafilococilor patogeni sînt aerobi și anaerobi facultativi. Tulpini de stafilococ patogen strict anaerobe sînt extrem de rare și prezintă o importanță redusă pentru diagnosticul infecțiilor stafilococice.

Caractere biochimice

Stafilococii fermentează numeroși carbohidrați, printre care glucoza, lactoza, maltoza, zaharoza etc. Tulpiniile patogene fermentează în plus manita. Coagulează laptele prin fermentarea lactozei, iar cheagul este deseori proteolizat.

Structura antigenică

Stafilococii au antigene de natură glucidopolipeptidică. Cercetările lui Julianelle și Wieghard au permis separarea stafilococilor în două grupuri mari, pe baza unor reacții de precipitare cu polizaharizii specifici de grup. Grupul A cuprinde stafilococii patogeni, și grupul B pe cei saprofiți. În grupul stafilococilor patogeni, Cowan și Oeding au reușit să delimiteze 3 subgrupuri serologice. Metodele serologice însă nu permit diferențierea tulpinilor de stafilococ din același subgrup. Aceasta face ca metodele serologice de diferențiere a stafilococilor să aibă deocamdată numai o importanță teoretică, rămînînd ca cercetări ulterioare să permită folosirea lor la diagnostic.

Cercetările lui Blair şi Downing au demonstrat că se pot stabili anumite asemănări şi deosebiri între tulpinile de stafilococ patogen, pe baza sensibilităţii lor la o serie de bacteriofagi antistafilococici de origine lizogenă.

Această metodă, cunoscută sub numele de *lizotipie bacteriofagică*, este oarecum comparabilă cu lizotipia bacililor tifici; ea poate fi aplicată numai tulpinilor patogene de stafilococ, coagulazo-pozitive, pentru că tulpinile coagulazo-negative nu sînt susceptibile la acţiunea preparatelor bacteriofagice folosite în lizotipie. În prezent se folosesc aproximativ 20 de tipuri fundamentale de bacteriofagi pentru lizotipia de rutină. Prin tipizare fagică s-a ajuns la constatarea că stafilococii patogeni se pot împărţi în 3 grupe mari, care corespund cu grupele serologice Cowan. Lizotipia stafilococică, în practică, stabileşte mai mult un diagnostic individual de tulpină şi mai puţin un diagnostic specific de tip, pentru că o tulpină de stafilococ izolată dintr-un produs patologic poate fi lizată de cîţiva din bacteriofagii standard folosiţi în lizotipie. Din cauza acestui aspect, nici lizotipia stafilococică nu este o metodă de clasificare, deci de diferenţiere netă între diferitele tulpini de stafilococi patogeni. Cu toate acestea ea are o mare valoare în cercetările epidemiologice, deoarece s-a constatat că o tulpină de stafilococ îşi păstrează constant tipul bacteriofagic, chiar în condiţiile trecerii succesive de la bolnav la purtător şi invers. Aceasta permite o judicioasă urmărire a filiaţiei cazurilor într-o epidemie şi o bună organizare a măsurilor de depistare şi combatere a purtătorilor de stafilococ patogen.

Metaboliţi bacterieni

Stafilococii pot determina infecţii la om prin intermediul a două proprietăţi şi anume, prin capacitatea lor de înmulţire şi de invazie şi prin producerea unor metaboliţi pe care îi secretă în cursul dezvoltării lor. Printre aceşti metaboliţi cei mai importanţi sînt:

Exotoxina. Este o substanţă filtrabilă termolabilă, care injectată la animale este letală, produce necroza dermului şi conţine hemolizine solubile. Exotoxina tratată cu formol se transformă în anatoxină stafilococică, un produs netoxic dar antigenic, care se foloseşte la om pentru stimularea imunităţii antitoxice faţă de stafilococ.

Leucocidina este o substanţă solubilă, care distruge leucocitele de la numeroase specii animale. Este antigenică dar mai puţin rezistentă la căldură decît exotoxina. Datorită leucocidinei stafilococii patogeni fagocitaţi sînt capabili să se înmulţească în interiorul leucocitului şi prin secreţia de leucocidină, să-i distrugă. Această proprietate lipseşte stafilococilor nepatogeni care sînt repede distruşi în interiorul celulei prin enzimele leucocitare.

Enterotoxina este tot un produs solubil, secretat de unele tulpini de stafilococ patogen. Enterotoxina rezistă la —30° şi la fierbere. Se deosebeşte de exotoxină prin rezistenţă termică marcată, prin structura antigenică deosebită şi prin tropismul accentuat pentru mucoasa intestinală. Enterotoxina este secretată de stafilococ cînd acesta contaminează alimentele bogate în carbohidraţi şi de consistenţă semifluidă, păstrate la temperatura camerei. Ingestia acestor alimente provoacă la om o toxiinfecţie alimentară acută sau se manifestă prin vărsături şi diaree. Aceleaşi simptome pot fi reproduse experimental administrînd *per os* enterotoxina la voluntari umani sau la maimuţe, sau prin injectare intraperitoneală la pisici tinere.

În laborator se poate evidenţia producerea de enterotoxină prin însămînţarea tulpinii de stafilococ în geloză nutritivă semisolidă 0,5% şi incubare la 37° în atmosferă cu 30% CO_2. Filtratul acestor culturi, încălzit 30 de minute la 100°, reprezintă enterotoxina. Injectat intraperitoneal la pisică, produce vărsături.

Coagulaza. Majoritatea stafilococilor patogeni pentru om produc această substanţă de natură enzimatică, care coagulează plasma oxalatată sau citratată de om, cal sau iepure. Datorită coagulazei, stafilococii patogeni pătrunşi în organism îşi creează un înveliş de fibrină, care îi protejează de acţiunea litică a enzimelor fagocitelor.

Alţi metaboliţi de natură enzimatică, secretaţi de stafilococi în cursul dezvoltării lor sînt: hialuronidaza sau factorul de difuziune, o stafilokinază sau fibrinolizina, care acţionează însă mult mai lent decît fibrinolizina streptococică. De asemenea mai produce proteinaze, fosfataze, lipaze şi carbohidraze, cu importanţă secundară în metabolismul bacteriilor.

Stabilirea caracterelor de patogenitate

Întrucît stafilococii sînt răspîndiţi peste tot în mediul extern, todeauna cînd se izolează o tulpină de stafilococ dintr-un produs patologic şi mai ales de la purtători se pune problema diferenţierii ei de stafilococii saprofiţi ubicuitari, care pot contamina cu uşurinţă produsul patologic. În acest scop se folosesc o serie de teste *in vitro* şi *in vivo*, caracteristice stafilococilor patogeni.

Testul hemolizei. Stafilococii patogeni sînt hemolitici. Se evidenţiază în special α-hemolizina, care produce hemoliza eritrocitelor de iepure şi β-hemolizina, care determină o hemoliză de tip cald-rece şi este secretată mai ales de tulpinile de provenienţă animală.

Testul fermentării manitei. Se foloseşte, fie un mediu lichid (apă peptonată turnesolată cu manită, 1%), fie mediul Champan solid. Fermentarea manitei se traduce prin acidificarea mediului şi virajul de culoare al indicatorului de pH.

Testul coagulazei. Proprietatea de a coagula plasma umană, de iepure sau de cal este o caracteristică importantă a stafilococilor patogeni. Stafilococii nepatogeni şi ceilalţi micrococi nu coagulează plasma sanguină. Majoritatea autorilor consideră capacitatea de coagulare a plasmei ca unul din testele cele mai importante de stabilire a caracterelor de patogenitate *in vitro* a stafilococilor. Testul se realizează astfel : se aspiră într-o pipetă sterilă de 10 ml, o cantitate de 1 ml dintr-o soluţie sterilă de oxalat de K sau citrat de Na 2% şi apoi se completează pînă la 10 ml cu sînge de iepure, de om sau de cal, se centrifughează 15 minute la 3 000 de ture şi se decantează steril plasma. Plasma oxalatată se distribuie în cantitate de 0,5 ml în tuburi de hemoliză sterile şi se adaugă, fie 0,5 ml dintr-o cultură de 16—20 de ore în bulion, fie conţinutul unei anse dintr-o cultură de 18—20 de ore pe agar înclinat. În paralel cu tulpina de testat se realizează un martor cu o tulpină de stafilococ coagulazopozitivă şi un alt martor cu o tulpină sigur coagulazonegativă.

Se incubează tuburile la 37° şi se examinează pentru apariţia coagulării, din 30 în 30 de minute, pînă la 6 ore. Dacă după intervalul de 6 ore nu a apărut coagularea şi martorul pozitiv arată o coagulare netă, se continuă incubaţia şi se examinează încă o dată după 18 ore, înainte de a considera rezultatele testului ca negativ.

Majoritatea tulpinilor de stafilococ coagulazo-pozitive produc coagularea în interval de 3 ore de la începutul incubaţiei. Stafilococii care au fost expuşi o perioadă mai îndelungată acţiunii antibioticelor manifestă tendinţa de a coagula lent plasma. Din aceste motive se prelungeşte incubaţia pînă la 18 ore, deşi în acest interval coagulul de plasmă poate fi dizolvat prin acţiunea fibrinolizinei stafilococice. Deci, tulpinile care coagulează lent plasma pot fi eronat considerate ca tulpini coagulazo-negative.

Bazaţi pe aceste constatări, este bine ca în practica de laborator să interpretăm ca test pozitiv chiar şi o coagulare incipientă, reprezentată de un coagul mic, care pluteşte în amestecul lichid. În ceea ce priveşte sursa de plasmă pe care o utilizăm în testul de coagulare, este preferabil să folosim plasma de iepure şi de cal şi mai puţin plasmă umană, pentru că primele două pot fi păstrate în bune condiţii 7—10 zile la gheţar, pe cîtă vreme plasma umană nu mai poate fi folosită dacă depăşeşte 3 zile de păstrare. Plasma poate fi folosită ca atare sau diluată 1/10 în ser fiziologic steril.

Testul fibrinolizinei. Prezenţa fibrinolizinei stafilococice se pune în evidenţă prin însămînţarea tulpinii izolate în plăci Petri care conţin un mediu alcătuit din 7 părţi geloză nutritivă 1,5% şi o parte plasmă oxalatată. După o incubaţie de 12—18 ore la 37° se observă o zonă clară în jurul coloniilor de stafilococi, datorită acţiunii fibrinolizinei, de topire a coagulului de plasmă produs de coagulază.

Testul creşterii pe medii hiperclorurate. Se foloseşte mai ales în cazul depistării purtătorilor sănătoşi de stafilococi patogeni în nas şi gît. Tampoanele cu exsudat din nas se însămînţează în mediul de îmbogăţire hiperclorurat, lichid cu o concentraţie în ClNa de 75‰, care datorită conţinutului crescut în ClNa, inhibează flora de asociere şi nu permite înmulţirea decît pentru stafilococ. După incubare 36 de ore la 37° pe acest mediu, se fac treceri pe mediul hiperclorurat solid Chapman, care conţine în plus, faţă de mediul anterior, agar, manită şi roşu de fenol. Din coloniile galbene, manito-pozitive, se fac subculturi pe geloză înclinată şi se studiază celelalte caractere de patogenitate.

Testul fosfatazei. Scindarea moleculei de fosfat prin fosfataza stafilococică corespunde cu producerea de coagulază şi poate fi utilizată ca test de patogenitate. Testul se realizează adăugînd unui mediu de cultură solid sau lichid fosfat de fenolftaleină în proporţie de 0,01%, care este incolor în mediu uşor alcalin. După însămînţarea stafilococului şi incubarea la 37° timp de 24 de ore, fosfataza stafilococică realizează scindarea moleculei de fosfat şi pune în libertate fenolftaleina. Dacă se adaugă cîteva picături dintr-o soluţie puternic alcalină sau se pune mediul în contact cu vapori de amoniac, se produce virajul de culoare spre roz, caracteristic fenolftaleinei în mediu alcalin. În caz că molecula de fosfat de fenolftaleină nu a fost clivată de fosfatază, fenolftaleina nu mai este pusă în libertate şi reacţia de culoare nu mai are loc.

Testul pigmentogenezei. Se realizează prin însămînţarea tulpinii de cercetat pe ser coagulat sau pe geloză nutritivă cu 10% lapte şi incubare 24 de ore la 37° pentru creştere şi apoi 2—3 zile la temperatura camerei pentru evidenţierea pigmentului. Stafilococii patogeni dezvoltă, în majoritatea cazurilor, un pigment de culoare galbenă-aurie. Pigmentaţia de culoare galbenă-citrin pînă la alb ca porţelanul se întîlneşte mai frecvent la stafilococii nepatogeni, deşi nu constituie o regulă absolută. Testul pigmentogenezei are o valoare ajutătoare în cadrul celorlalte teste de patogenitate *in vitro*.

Testul de patogenitate pe animal. Iepurele este cel mai sensibil dintre toate animalele de laborator. Pe cale intravenoasă se realizează o septicemie mortală; pe cale subcutanată şi intramusculară apar abcese localizate. Prin injecţia intradermică la iepure a toxinei stafilococice se evidenţiază *acţiunea dermonecrotică*. Şoarecele fiind mai rezistent poate fi infectat experimental pe cale intraperitoneală dacă la inoculul de cultură se adaugă şi o cantitate de mucină, care împiedică acţiunea de apărare celulară şi favorizează astfel pătrunderea infecţiei. Şoarecele mai poate fi infectat experimental prin injectarea intravenoasă sau intrapleurală de 0,2 ml cultură stafilococică, de 18 ore.

Atît şoarecelui, cît şi cobaiului li se pot modifica reactivitatea faţă de stafilococ, prin hipotermie sau administrare prealabilă de cortizon. Ambele favorizează difuzarea infecţiei stafilococice în ţesuturi şi contribuie la diseminarea stafilococilor în organism.

Diagnosticul de laborator

La recoltarea produselor patologice din variatele localizări pe care le determină stafilococii patogeni la om trebuie să luăm totdeauna cele mai riguroase precauţii pentru a evita contaminarea produsului patologic cu stafilococi de pe piele sau din mediul înconjurător.

În colecţiile purulente închise, abcese, flegmoane, se recoltează puroiul prin puncţie cu o seringă sterilă prevăzută cu ac gros, după o riguroasă antiseptizare prealabilă a pielii în locul unde se face puncţia. În meningite şi pleurezii se recoltează prin puncţie cu seringa sterilă şi ac special lichidul cefalo-rahidian sau lichidul pleural, în condiţii de asepsie riguroasă. Din colecţiile superficiale şi din plăgile deschise se recoltează, cu pipeta Pasteur, cu ansa bacteriologică, cu un tampon, cu o compresă sterilă, sau orice instrument chirurgical steril, respectînd precauţia de a nu atinge pielea. În septicemii se recoltează sînge după tehnica hemoculturii, cu precauţii deosebite de antisepsie şi asepsie, cu simplificarea la maximum a tehnicii de recoltare şi însămînţare a sîngelui, pentru a preveni contaminările secundare. În mediul de cultură este util să se adauge acid paraaminobenzoic [1] sau penicilinază [2], în caz că recoltarea s-a făcut de la un bolnav sub tratament cu sulfamide şi penicilină.

În toxiinfecţiile alimentare se recoltează vomismentele, materiile fecale de la bolnav şi o porţiune din alimentul incriminat în producerea toxiinfecţiei. Pentru depistarea purtătorilor de stafilococ patogen în rinofaringe se recoltează exsudat faringian sau nazal, cu tampoane sterile.

Etapele diagnosticului. Din produsele purulente se face obişnuit un frotiu pe care îl colorăm după metoda Gram, în care stabilim prezenţa cocilor gram-pozitivi izolaţi sau în grămezi, fagocitaţi sau extracelulari şi nenumărate celule polimorfonucleare distruse sau intacte.

Însămînţările produsului patologic se fac pe geloză înclinată şi bulion. Dintr-o colonie izolată pe geloză înclinată cu caracteristicile de creştere ale stafilococului se face un frotiu de control colorat Gram, care arată prezenţa cocilor gram-pozitivi în grămezi şi ciorchine caracteristice şi o subcultură în bulion şi pe geloză înclinată pentru antibiogramă şi testele de patogenitate. În cazul unui produs alimentar incriminat într-o toxiinfecţie sau în cazul depistării purtătorilor de stafilococ, se însămînţează în mediul de îmbogățire hiperclorurat lichid (Chapman) și după 48 de ore de termostatare la 37° se fac treceri pe mediul solid selectiv Chapman.

---

[1] 1 ml soluţie sterilă 1‰ de acid paraaminobezoic la 100 ml mediu de cultură sau 1 ml dintr-o soluţie 1% novocaină.

[2] 1 ml dintr-un filtrat de cultură de 5 zile de *Esch. coli* în bulion, la 100 ml mediu.

Coloniile manitopozitive, de culoare galbenă, pe mediul Chapman, sînt selecționate și trecute în subculturi pentru efectuarea testelor de patogenitate *in vitro* și *in vivo*.

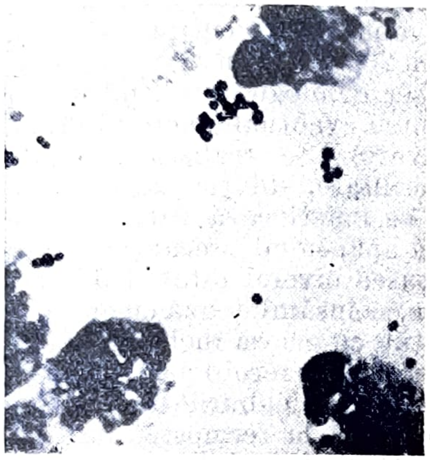


Fig. 290. — Staphylococcus aureus, frotiu din puroi (colorație Gram).

În cazul toxiinfecțiilor alimentare este util să se efectueze un frotiu direct și diluții pentru numărătoare de microbi din alimentul incriminat. Prezența în număr mare a stafilococilor în aliment oferă un criteriu de prezumție pentru considerarea ca aliment contaminat.

Diagnosticul de laborator în cazul toxiinfecțiilor alimentare nu trebuie să se limiteze doar la stabilirea testelor de patogenitate *in vitro* și *in vivo*, pentru că nu toți stafilococii patogeni au capacitatea de a secreta enterotoxina. Este necesar să completăm, în aceste cazuri, diagnosticul, evidențiind producerea de enterotoxină prin însămînțarea tulpinii izolate în geloză semisolidă 0,5% și incubare în atmosferă cu 20% CO_2. Filtratul acestor culturi, obținut prin trecere pe filtre Seitz EKS și încălzit 30 de minute la 100°, reprezintă enterotoxina, pe care o identificăm experimental prin intermediul testului Dolman (inoculare intraperitoneală a 1—3 ml filtrat la pisici tinere de 500—800 g), care evidențiază enterotropismul toxinei prin apariția, după 15—120 de minute, a unei stări de neliniște, urmată de somnolență, vărsături și diaree; testul pentru evidențierea acțiunii enterotoxinei pe pisică poate fi efectuat și după o tehnică mai simplificată, descrisă de Hammon : tulpina de stafilococ de cercetat se cultivă într-un tub cu 20 ml bulion timp de minimum 5 zile. Apoi se fierbe cultura timp de 30 de minute. Se transvazează într-un tub de centrifugă steril și după centrifugare 10 minute la 3 000 de ture/min. Se decantează steril supernatantul. Se injectează la pisică intravenos, în vena safenă, 2 ml supernatant. Vom lua precauția de a da animalului o mică cantitate de mîncare înaintea injectării. Prezența enterotoxinei este indicată prin apariția vomismentelor în interval de 15 minute pînă la 2 ore, obișnuit la 30 de minute după injecție. Frisoane, febră și ușoară diaree pot să urmeze vărsăturilor în intervalul de 2—4 ore după injectarea enterotoxinei. În 24—48 de ore, animalul își revine la normal.

În cazul purtătorilor de stafilococ și mai ales în cazul studiului epidemiologic al unei izbucniri epidemice intraspitalicești cu stafilococ, sînt de mare utilitate completarea diagnosticului prin lizotipie bacteriofagică și încadrarea în cele IV grupuri fagice de stafilococ a tipurilor corespunzătoare.

Testarea sensibilității la antibiotice și chimioterapice

O serie întreagă de compuși sulfamidați și antibiotice au efect asupra stafilococilor, iar testarea sensibilității *in vitro* a microbului izolat prin antibiogramă este foarte utilă, pentru că permite alegerea agentului terapeutic cel mai activ și o eventuală asociere a 2 sau 3 substanțe active, care acționează sinergic. Cu toate acestea, în cazul infecțiilor stafilococice în special, posibilitatea rapidă a microbului de a dezvolta o rezistență la orice chimioterapie și în special la cele cu folosință largă face deosebit de dificilă eradicarea stafilococilor patogeni de la indivizi infectați. Infecții stafilococice ale pielii, furunculoze, apar în special la adolescenți, unde sînt favorizați de factori hormonali. Infecții similare se întîlnesc deseori și la indivizi sub tratament îndelungat cu hormoni corticoizi.

Epidemiologie și profilaxie

Principalele surse de infecție sînt leziunile umane, obiectele contaminate cu puroiul din leziuni și căile respiratorii superioare ale omului. Infecțiile aeriene prin tuse, vorbit și strănut au căpătat o importanță deosebită în spitale, unde o mare proporție de bolnavi și din personalul medical și auxiliar sînt purtători de stafilococi patogeni în nas și gît. Neglijarea măsurilor de igienă individuală, curățenie și asepsie riguroasă, ca și a controlului circuitului bolnavilor în spitale, favorizează întinderea infecțiilor în toată colectivitatea spitalicească. Aerosolii cu antibiotice și radiațiile ultraviolete au o valoare limitată. În multe spitale, din cauza folosirii pe scară întinsă a antibioticelor celor mai variate, apar în rinofaringele purtătorilor tulpini de stafilococi rezistenți la toate antibioticele uzuale și care aparțin aceluiași tip fagic. Tipizarea prin fag, selecționarea și sterilizarea purtătorilor de stafilococ, asociate cu riguroase măsuri de igienă, antisepsie, controlul circuitului funcțional al spitalului și păstrarea a 1—2 antibiotice de rezervă pot stăvili difuzarea unei infecții stafilococice intraspitalicești.

Tehnica preparării unui autovaccin antistafilococic

Se folosește tulpina de stafilococ izolată de la un bolnav, cultivată în bulion 4—5 zile, la 37°, pentru a putea încorpora în vaccin și toxinele secretate de microbi lent, în mediul de cultură. Cultura se poate face și pe geloză înclinată : în acest caz, după o incubație de 24 de ore la 37° se aspiră, cu o pipetă Pasteur sterilă, lichidul de condensare din tubul de cultură și se aruncă într-un pahar conic cu amestec oxidant. Apoi, cu o pipetă sterilă, se adaugă peste cultură 3 ml ser fiziologic steril și se aspiră de cîteva ori, pentru a realiza o suspensie densă a microbilor în serul fiziologic. Trebuie să ne ferim de a zgîria sau a rupe geloza pe care s-a făcut cultura, pentru a nu antrena în vaccin și părțile de mediu. Suspensia densă de bacterii astfel realizată este transferată într-o eprubetă sterilă cu perle de sticlă ; aici agităm suspensia, pentru a desprinde eventualele conglomerate de microbi. Pentru a realiza concentrația dorită, un miliard de bacterii pe ml, folosim metoda nefelometrică. Din suspensia realizată se ia 1 ml cu o pipetă sterilă și se trece în tubul comparator sau înt-o eprubetă comparatoare a scarei nefelometrice Brown. Un etalon improvizat se poate realiza adăugînd, la 8 ml vaccin antitifoparatific, 4 ml ser fiziologic, obținîndu-se o suspensie cu opacitate echivalentă cu 1 miliard de bacterii pe ml. În eprubeta comparatoare se adaugă cantități măsurate de ser fiziologic, pînă cînd obținem aceeași opacitate cu a tubului din scara nefelometrică, care indică 1 miliard de bacterii/ml. Aceasta înseamnă că la opacitatea realizată de noi prin diluarea suspensiei inițiale corespunde o concentrație de 1 miliard de bacterii pe ml. În acest fel se poate calcula ușor ce cantitate de suspensie și ser fiziologic trebuie să folosim pentru a prepara 20 ml vaccin. De exemplu, la 1 ml suspensie inițială s-au adăugat 5 ml ser fiziologic, pentru a obține concentrația de 1 miliard pe ml. Pentru 20 ml vaccin se vor lua 4 ml suspensie și 20 ml ser fiziologic (cei 4 ml în plus sînt necesari pentru eventuale pierderi prin evaporare, la inactivare). Se realizează apoi, în condiții de sterilitate, diluția stabilită prin nefelometrie și se inactivează vaccinul, o oră la 60°, în baie de apă, luînd precauția ca apa fierbinte să depășească nivelul diluției de vaccin. După inactivare, se însămînțează cu cîte o picătură de vaccin 1 tub cu geloză înclinată și cîte 1 tub cu bulion (aerob și anaerob) pentru controlul inactivării și sterilității. Tuburile de control se păstrează o săptămînă la termostat la 37° și vaccinul la gheţar. Dacă după intervalul de o săptămînă tuburile de control rămîn sterile, vaccinul se fenolează în proporție de o picătură din soluția 1% fenol la 2 ml vaccin și se repartizează steril în fiole de 1 ml sau într-o fiolă de penicilină folosită. Pe cutia de fiole sau pe fiola de penicilină se vor nota pe o etichetă numele și prenumele bonavului, autovaccin stafilococic 1 miliard/ml și indicații asupra dozajului 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ml, subcutanat etc.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL *INFECȚIILOR* CU MICROBI DIN *GENUL GAFFKYA ȘI SARCINA*

Familia : *Micrococcaceae*. Genul : *Gaffkya*. Specia tip : *Gaffkya tetragena*.

Este un coc dispus în tetrade ; a fost izolat în 1881, de Gaffky, din puroi. Diviziunea se face după două planuri perpendiculare, se colorează gram-pozitiv și în organism formează uneori capsulă.

Se găsește în căile respiratorii superioare ca parazit comensal și în flora de asociere din forma cavitară a tuberculozei pulmonare, în abcese și supurațiile pulmonare.

Diagnosticul bacteriologic se bazează pe aspectul morfologic al microbului în frotiu direct, coc dispus în tetrade, gram-pozitiv, și pe dezvoltarea pe mediile de cultură.

Pe medii solide (geloză) apar colonii opace, rotunde, albe, asemănătoare cu cele de stafilococ alb, deseori aderente la mediu. În bulion tulbură uniform mediul, apoi depune. Inoculat intraperitoneal, la şoarecele alb, determină o infecţie septicemică mortală. Microbul este sensibil la penicilină şi alte antibiotice.

SARCINA

Sarcina ventriculi: (Goodser, 1842).
Sarcina aurantiaca, lutea, alba.

Este un coc sferoid, cu variante pigmentate, dispus în pachete cu formă cubică, datorită tipului de diviziune, care se face după trei planuri. Este saprofit. Se găseşte pe piele, în conţinutul intestinal în cazuri de gastrită, *S. ventriculi*, asociat în afecţiuni purulente, şi de cele mai multe ori în mediu extern, aer, apă, pămînt. Caracterele de cultură sînt asemănătoare cu cele ale tetragenului; se colorează gram-pozitiv.

Ambele specii au valoare pentru diagnosticul diferenţial cu celelalte micrococcacee patogene.

SCHEMA DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR ÎN INFECŢIILE STAFILOCOCICE

Schema A

Produs patologic: puroi, spută, exsudat, lichid pleural, articular, peritoneal, cefalorahidian, urină etc.

- Frotiu direct din produs pe 2 lame, coloraţie Gram şi albastru de metilen. În cazul exsudatului seroaselor, lichidului cefalorahidian şi urinei, frotiurile se efectuează din sedimentul de centrifugare. Se colorează cu Gram, Giemsa pentru formula citologică.
- Însămînţare în bulion şi geloză sînge pentru obţinerea coloniilor izolate.
- Treceri pe geloză înclinată şi bulion dintr-o jumătate colonie izolată. Din cealaltă jumătate de colonie se face un frotiu colorat cu Gram.

După 24 de ore se poate elibera un buletin provizoriu de analiză, în care se indică rezultatul examenului microscopic direct, eventual formula citologică şi interpretarea ei, aspectul coloniei şi hemolizei precum şi a frotiului din colonia izolată, colorat Gram.

- Din cultura în bulion se efectuează antibiograma şi eventual se inoculează intraperitoneal la 2 şoareci sau intradermic la iepure.
- Din cultura pe geloză înclinată se fac treceri pentru testele de patogenitate *in vitro*:
  - testul hemolizei;
  - „ fibrinolizinei;
  - „ coagulazei;
  - „ fermentării manitei; } Chapman;
  - „ creşterii pe medii hiperclorurate } Chapman;
  - „ pigmentogenezei.
- Citirea testelor de patogenitate *in vitro* şi *in vivo* şi a antibiogramei.

Formularea buletinului definitiv de analiză cu indicarea spectrului de sensibilitate la antibiotice.

SCHEMA DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR ÎN INFECŢIILE STAFILOCOCICE

Schema B

***Produs patologic*:** sînge din septicemie recoltat prin tehnica hemoculturii

10–20 ml sînge recoltat aseptic prin puncţie venoasă direct într-un balonaş cu 250–300 ml bulion. (Eventual cu adaos de liquoid, penicilinază sau PABA, dacă este cazul).

Eventual frotiu direct din sînge în strat subţire colorat cu Giemsa.

Eventual incubarea unui al 2-lea balonaş cu 10 ml sînge în 250–300 ml bulion în condiţii de microaerofilie.

Controlul creşterii microbiene în hemocultură:
- prin urmărirea apariţiei bulionului şi al aspectului caracteristic al formării de microcheaguri, datorită coagulazei stafilococice;

— prin treceri pe geloză-sînge și bulion ;

— prin examen microscopic între lamă și lamelă.

↙	↘	
În cazul trecerilor negative, se urmărește hemocultura zilnic prin treceri și examen microscopic. **Abia după 14 zile** de incubare se consideră hemocultura negativă.	În cazul transplantelor pozitive pe geloza înclinată și bulion se controlează puritatea culturilor prin frotiu, se fac însămînțări din bulion pentru antibiogramă pe plăci de geloză-sînge.	Se eliberează un buletin provizoriu de analiză în care se indică prezența unui micrococ gram-pozitiv hemolitic în hemocultură.
	Pe geloză-sînge se controlează testul hemolizei și se însămînțează pentru restul testelor de patogenitate *in vitro* și se inoculează intraperitoneal la 2 șoareci, sau intradermic la iepure. Se citește antibiograma și restul testelor de patogenitate *in vitro* și *in vivo*.	Se eliberează buletinul definitiv de analiză, în care se indică toate caracterele stafilococului patogen izolat și sensibilitatea la antibiotice.

Notă. Atenție la concluziile de patogenitate. Cînd testele de patogenitate nu sînt edificatoare pentru o tulpină de stafilococ patogen, se recomandă repetarea hemoculturii pentru că este posibil ca printr-o deficiență de asepsie să se fi recoltat un stafilococ de pe tegumente.

SCHEMA DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE STAFILOCOCICE

Schema C

Produs patologic : exsudatul rinofaringian și amigdalian pentru diagnosticul stării de purtător.

Însămînțarea tampoanelor cu exsudat rinofaringian și amigdalian, chiar la locul recoltării sau cel mult după o oră de la recoltare, în tuburi cu mediul de îmbogățire Chapmann lichid. Incubare timp de 48 de ore, la 37°.

Se scot tampoanele din tuburi și din mediul de îmbogățire, se fac treceri în striuri paralele, prin tehnica epuizării ansei pe mediul Chapmann solid, pentru a obține colonii izolate.

Se face citirea plăcilor cu mediu Chapmann. Coloniile manito-pozitive de culoare galbenă sînt trecute în bulion și pentru testele de patogenitate *in vitro*.

Se efectuează testele de patogenitate *in vitro*. Din bulion se însămînțează pe plăci cu geloză-sînge pentru antibiogramă și se inoculează 2 șoareci intrapleural, sau intradermic la iepure.

Se citesc testele de patogenitate, se citește antibiograma și se eliberează buletinul de analiză care confirmă starea de purtător de stafilococ patogen cu mențiunea spectrului de sensibilitate la antibiotice a tulpinii.

În cazurile de infecții intraspitalicești cu stafilococ, tulpinile izolate de la purtător vor fi trimise pentru lizotipie la Centrul național de bacteriofag referință, de pe lîngă Institutul „Dr. I. Cantacuzino", în vederea investigațiilor epidemiologice și a aplicării măsurilor de combatere și profilaxie.

SCHEMA DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE STAFILOCOCICE

Schema D

Produs patologic în cazurile de toxiinfecție alimentară : materii fecale, vomismente, alimente contaminate, exsudate rinofaringiene, puroi din leziuni deschise de la persoanele care mînuiesc alimente și presupuse ca surse de contaminare a alimentelor.

— Se fac frotiuri directe din produs și se colorează cu albastru de metilen și Gram.

— Se fac suspensii în apă distilată sterilă din produsele patologice sau alimente lichide și după triturare din cele solide și se însămînțează în mediul de îmbogățire lichid (eventual în situații de necesitate urgentă se renunță la etapa de îmbogățire).

— Se fac subculturi din mediul de îmbogățire lichid prin epuizarea ansei pe mediul solid hiperclorurat Chapmann, pentru a obține colonii izolate. Atît coloniile manito-pozitive galbene, cît și cele manito-negative roz se trec pe geloză și bulion pentru studiul testelor de patogenitate și prepararea enterotoxinei.

— Culturile în bulion în vîrstă de 5–8 ore se însămînțează în geloză moale 0,5 % și se incubează timp de 48 de ore la 37° atmosferă cu 20 % CO_2. Se taie apoi geloza în bucăți și se stoarce prin tifon. Lichidul obținut se filtrează prin Seitz. Filtratul se fierbe timp de 30 de minute, apoi se injectează intraperitoneal la pisică după tehnica Dolman sau Hammon.

Se eliberează buletinul de analiză, prin care se confirmă existența unei tulpini enterotoxice de stafilococ, în produsul patologic sau alimentele suspecte.

BIBLIOGRAFIE

AFANASIEVA M. V. — Colitele și enterocolitele stafilococice la copii mici. *Probleme de patologie infecțioasă* (din literatura sovietică de specialitate), 1960, nr. 4 p. 106—114.

BAILIOZOV D., PANAIOTOVA M., VESELINOV V. — — Asupra metodelor decelării enterotoxinei stafilococice, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1962, nr. 8, p. 101—103.

BAKLANOVA V. F., ZVEAGHINȚEVA S. G., ZUBKOVA V. L., TIURKEAN R. A. — Pneumoniile stafilococice la sugari. *Probleme de patologie infecțioasă* (din literatura sovietică de specialitate), 1960, nr. 4, p. 93—106.

BLAIR E. J. — Laboratory diagnosis of staphylococcal infections *Bull. O.M.S.*, 1958, vol. 18, p. 291—308.

BLAIR E. J. — Bacterial and mycotic infections in man, editat de Dubos J. R., ed. a II-a, Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 358—378.

BLAIR E. J., WILLIAMS O. G. R. —Phage typing of staphylococci, *Bull. O.M.S.*, 1961, vol. 24, p. 771—784.

CHAPMANN G. H. — The significance of sodium chloride in studies of staphylococci, *J. Bact.*, 1945, nr. 50, p. 201.

COMOROȘAN S. — Stafilocoagulaza, *Microbiologia (București)*, 1959, nr. 2, p. 97—102.

DĂNILĂ P. — Contribuție la diagnosticul bacteriologic al infecțiilor stafilococice, *Microbiologia (București)*, 1957, nr. 2, p. 175—180.

DACK G. M. — Food Poisoning, University of Chicago Press, Chicago, 1943.

Mc DERMOTT W. — The problem of staphylococcal infections, *Brit. med. J.*, 1956, octombrie, p. 837—840.

DOLMAN C. E., WILSON R. J. — The kitten test for staphylococcus enterotoxin, *J. Immunol.*, 1940, vol. 35, p. 13—30.

DUMAS J. — Bacteriologie medicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 287—302.

FROBISHER M. — Fundamentals of bacteriology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Philadelphia, 1949.

GASTINEL P. — Précis de bacteriologie médicale, ed. a 2- a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 307—326.

O'GRADY F., WITTSTADT F. B. — Nasal Carriage of staphylococcus pyogenes, *Amer. J. Hyg.*, 1962, vol. 75, nr. 1, p. 136—145.

GRAY J. E., WILKINS J. R., PRESTRU D., MILTRED C., NIKITAS CHARLOTTE T. — Further characterisation of an experimental staphylococcal infection in Mice, *J. Infect. Dis.*, 1957, vol. 101, nr. 2, p. 137—147.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 81—90.

HAMMON C. — Cat test for staphylococcus enterotoxin, *Amer. J. Publ. Hlth.*, 1941, vol. 31, p. 1 191.

IAROȘENKO V. A. — Apreciere comparativă a metodelor de depistare a cocilor patogeni în aerul încăperilor de spital. *Probleme de patologie infecțioasă* (din literatura sovietică de specialitate), 1961, nr. 4, p. 104—112, Ed. Acad. R.P.R., Inst. de studii romîno-sovietic.

IENIȘTEA C. — Microbiologia alimentelor, Ed. medicală, București, 1958.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approved laboratory tehniques, ed. a 4-a, Ed. Appletou-Century, New York, 1945, p. 423—425.

KNOX R., SMITH J. T. — The nature of penicillin resistance in staphylococci, *Lancet*, 1961, nr. 201, p. 520.

MACKIE T. J., MC CARTNEY J. E., — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 329.

MEITERT E., BOCÎRNEA C., FRIEDMAN I., DEDIU S. — — Toxinfecția alimentară cu stafilococ. Contribuții la studiul aspecteor clinice, bacteriologice și epidemiologice, *Z. Hyg. Infekt. Kr.*, 1957, nr. 6, p. 623—644.

MOROZ F. A. — Caracterul evoluției procesului infecțios provocat la șoareci de culturi de stafilococ auriu rezistente și sensibile la antibiotice, *Probleme de patologie infecțioasă* (din literatura sovietică de specialitate), 1960, nr. 6, p. 58—66.

NESTORESCU N., POPOVICI M. — Toxiinfecțiile alimentare, Ed. medicală, București, 1959, p. 31.

NICOLESCU MARCELA — Stafilococul ca agent patogen al toxiinfecțiilor alimentare, *Microbiologia (București)*, 1960, nr. 4, p. 313—323.

OSTROVSKI A. D. — Despre sensibilitatea stafilococilor față de unele antibiotice noi, *Probleme de patologie infecțioasă* (din literatura sovietică de specialitate), 1960, nr. 3, p. 147—151, — Ed. Acad. R.P.R., Inst. de studii romîno-sovietic.

OSTROVSKI A. D. — Studiul clinico-bacteriologic și experimental al infecției stafilococice la organismul în dezvoltare, *Probleme de patologie infecțioasă* (din literatura sovietică de specialitate), 1960, nr. 4, p. 62—68. Ed. Acad. R.P.R., Inst. de studii romîno-sovietic.

PÖHN H. P. — The differentiation of staphylococci, *Z. Immun.-Forsch.*, 1958, vol. 116, nr. 1/2, p. 92—108.

POPOVICI M., NESTORESCU N. — Bacteriologie medicală (sub red. prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, București, 1961, p. 333—351.

RANFT-HÄUSSLER A., PÖHN H. P. — Beobachtungen über die Ausbreitung von Staphylokokken-Mastiden in einer Geburtshilflichen Klinik. Ein Beitrag zur Frage des Staphylokokken „Hospitalismus", *Dtsch. med. wschr.*, 1959, vol. 84, p. 817—820.

RANKING D. L. — Antibiotic-resistant staphylococcal disease : an obstetric, surjical, paediatric and hospital administrative problem, *S. Afr. med. J.*, 1959, vol. 33, nr. 26, p. 529—533.

SEMENOVA E. I. — Afecțiunile stafilococice la copii în primele trei luni de viață. Probleme de patologie infecțioasă (din literatura sovietică de specialitate), 1960, nr. 4, p. 85—93.

STERN A. I. — Rolul infecției stafilococice în morbiditatea nou-născuților, *Probleme de patologie infecțioasă* (din literatura sovietică de specialitate), 1960, nr. 4, p. 76—85, Ed. Acad. R.P.R., Inst. de studii romîno-sovietic.

STITT E. R., CLOUGH W. P., BRANHAM E. SARA — Practical Bacteriology, Hematology and Parasitology, ed. a 10-a, Ed. Blakiston, New-York, 1948, p. 45—48.

THOMPSON R. N. — Microbiology and epidemiology, ed. a 14-a, Ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 1958, p. 426, 428, 348—349.

VÎDOGCIKOV G. V. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecțioase, Ed. științifică, București, 1952, p. [illegible].

VOGELSANG T. M. — Carriage of phage patterns for pathogenic staphylococci in medical students, *Acta path. microbiol. scand.*, 1958, vol. 43, nr. 2, p. 196—210.

VOSKRESENSKI V. B., DIMITRIEVA A. I., LEBEDEVA Z. I. — Experiența profilaxiei afecțiunilor stafilococice în maternități, prin imunizarea femeilor gravide cu anatoxină stafilococică, *Probleme de patologie infecțioasă din literatura sovietică de specialitate*, 1961, nr. 4, p. 112—129. (Ed. Acad. R.P.R., Institutul de studii romîno-sovietic).

WHITBY L., AYNES M. — Medical Bacteriology, ed. a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 142.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959 p. 244—257.

WILLIAMS R.E.O. — Epidemic staphylococci, *Lancet*, 1959, nr. 24, p. 190—195.

WILSON G. S., MILES A. A. — Topley and Wilsonss Principles of Bacteriology and Immunity, ed. a 4-a, Ed. E. Arnold, Londra, 1955, p. 699—721.

ZINSSER H. — Bacteriology, ed. a 11-a, Ed. Appleton-Century, New York, 1957, p. 243—251.

DERKACH V. N. — Asupra diferențierii stafilococilor patogeni de cei nepatogeni, *Ž. Mikrobiol (MOSK)*, 1957, nr. 12, p. 12—15.

KNIJNIKOV A. A., KASSATKINA I. L. — Asupra evaluării patogenității și enterotoxicității stafilococului, *Ž. Microbiol.* (*Mosk.*), 1957, nr. 1, p. 80—84.

MARKOVA I.A. — Valoarea comparativă a metodelor de determinarea proprietăților hemolitice ale stafilococilor cultivați pe medii solide și în bulion tamponat *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1957, nr. 2, p. 24—26.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PNEUMOCOCICE

Familia : *Lactobacteriaceae*. Genul : *Diplococcus*. Specia tip : *Diplococcus pneumoniae Weichselbaum*.

Generalități

Coc lanceolat, așezat în diplo sau lanțuri scurte, incapsulat în organism, în produsele patologice și în mediile de cultură cu substanțe organice ; imobil, gram-pozitiv. Forma caracteristică de coc lanceolat sau în flacără de lumînare, în care o extremitate este rotunjită și cealaltă ascuțită, alături de așezarea caracteristică în diplo cu vîrfurile ascuțite față în față și lanțuri de diplo, ne ajută mult la diagnosticul direct în produsul patologic. În produsele patologice este totdeauna incapsulat. Capsula se întîlnește numai la tulpinile patogene și are o structură polizaharidică complexă, care conferă specificitate antigenică de tip. Capsula poate fi colorată numai cu metode speciale pentru colorația capsulei, cum este de pildă, metoda Hiss.

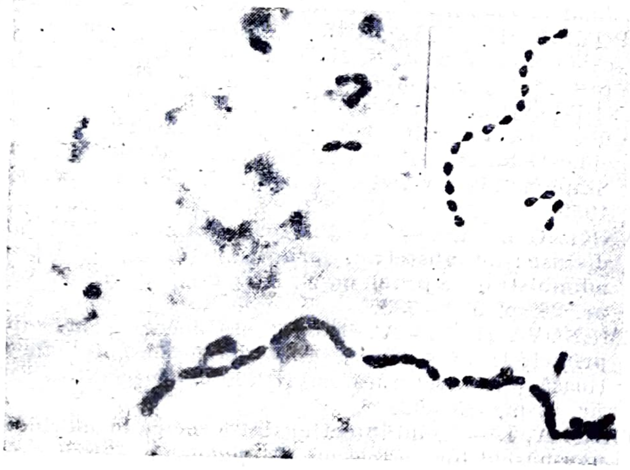


Fig. 291. — Diplococcus pneumoniae, frotiu din cultură în bulion (colorație Gram).

Pneumococul este foarte răspîndit în cavitățile naturale : gură, nas, căile respiratorii superioare, faringe, ca parazit comensal.

Boala la om

Agent patogen al pneumoniei lobare acute, poate provoca bronhopneumonii, abcese pulmonare, congestii pulmonare, pleurezii purulente metapneumonice, pleurezii, meningite, encefalite, angine, abcese, infecții oculare, conjunctivite, keratite. Mai rar poate determina otite, mastoidite, sinuzite, pericardite, peritonite, endocardite vegetante și septicemii. Poate fi întîlnit ca microb de asociație în gripă, tuse convulsivă, rujeolă etc.

Recoltarea produselor patologice variază după localizarea infecției provocate de pneumococ :

— sputa se recoltează în vase sterile, de obicei plăci Petri. În caz că bolnavul a făcut gargarisme cu antiseptice, se amînă recoltarea cu cîteva ore ;

— lichidul pleural, peritoneal, puroiul din abcese se recoltează prin puncție cu seringa sterilă ;

— lichidul cefalorahidian, prin puncție lombară ;

— sîngele pentru hemocultură se recoltează după tehnica prin puncție venoasă, în condiții de strictă asepsie.

De la animalul de laborator inoculat experimental se recoltează steril fragmente din organele bogat vascularizate, ca splină și ficat ; se face o hemocultură din inimă imediat după moarte sau după sacrificarea animalului.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu pneumococ comportă următoarele etape :

1. examenul macroscopic al produsului ;
2. examenul microscopic în frotiu direct ;
3. însămînțarea și izolarea microbului ;
4. inocularea la animalul de elecție ;
5. studiul caracterelor biochimice și al structurii antigenice.

Examenul macroscopic al produsului patologic sau aspectul exsudatelor poate furniza informații prețioase: de exemplu, sputa pneumococică are aspect roșu-cărămiziu-ruginiu, puroiul cu pneumococ este cremos, filant și uneori verzui.

Examenul microscopic în frotiu direct, după colorație cu albastru de metilen și cu metoda Gram, arată coci lanceolați, așezați în diplo sau în lanțuri de 4—6 indivizi, incapsulați, gram-pozitiv. În frotiul direct din spută, pneumococul apare într-o asociație microbiană variată (streptococ, stafilococ, micrococ cataral), cu morfologia cunoscută.

Tabloul citologic arată o reacție acută polimorfonucleară, însoțită de celule descuamative din căile respiratorii superioare. În exsudatele purulente monomicrobiene, pneumococul apare sub formă de diplococi alungiți, lanceolați, cu capsula sub forma unei zone clare, care înconjură corpul microbian. Cîteodată pneumococul se așază în lanțuri scurte, ceea ce îngreuiază diagnosticul diferențial cu streptococul.

Însămînțarea produselor patologice se face numai pe medii speciale: pneumococul se dezvoltă greu pe medii obișnuite.

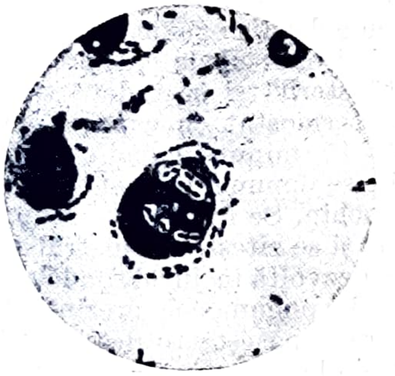


Fig. 292. — Diplococcus pneumoniae, frotiu din puroi. Se văd diplococi incapsulați fagocitați de un leucocit (colorație albastru de metilen).

În medii lichide, bulion ser, bulion ascită, bulion-sînge, bulion glucozat TIEM sau în mediul *T*-Truche, compus din apă peptonată, clorurată și glucozată, pneumococul crește omogen, cu ușor depozit la fundul tubului. Incubat în atmosferă cu adaos de 10% CO_2, pneumococul se dezvoltă mai bine.

În medii solide, geloză-ser, geloză-ascită, geloza *T*-Truche sau pe geloză-sînge glucozată, pneumococul crește în colonii mici transparente, incolore, caracteristice, asemănătoare «picăturilor de rouă». Pe geloză-sînge coloniile de pneumococ sînt înconjurate de o zonă verzuie de α-hemoliză, datorită transformării hemoglobinei în methemoglobină. Frotiurile din

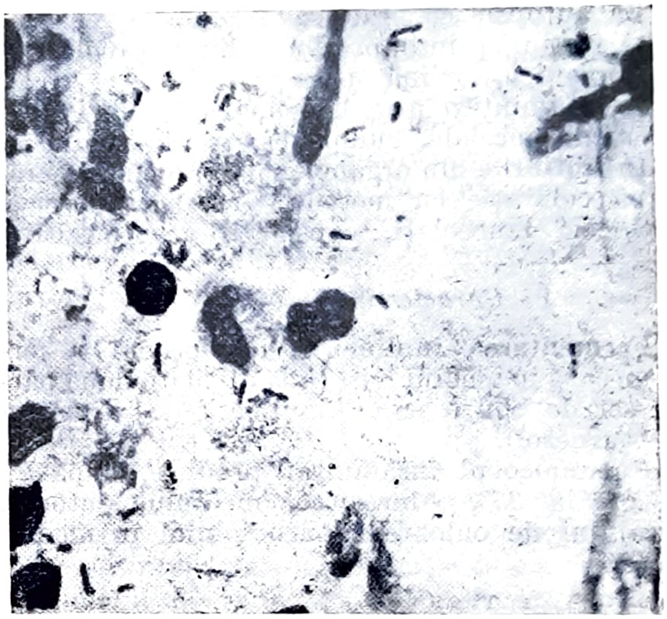


Fig. 293. — Septicemie experimentală cu *Diplococcus pneumoniae* la șoarece. Amprentă splină. Colorație Gram (colecția autorului).

culturi vor fi examinate după colorație cu metoda Gram, arătînd aceiași diplococi gram-pozitivi, așezați în diplo sau în lanțuri scurte, cu zona clară împrejurul germenului. De notat că pneumococul formează capsulă numai pe medii bogate în albumină și în organism.

Inocularea produselor patologice se face la șoarecele alb, animal de elecție pentru infecția pneumococică experimentală.

Calea de inoculare se alege în funcție de produsul patologic cercetat. Calea subcutanată se folosește pentru sputa pneumococică și alte produse care conțin floră de asociație. În acest caz, calea intraperitoneală provoacă o peritonită nespecifică, datorită florei de asociație din produs.

Intraperitoneal se inoculează produsele monomicrobiene, care prezintă în frotiul direct numai pneumococul. De exemplu: lichid cefalorahidian, lichid pleural etc.

Inocularea la animalul de elecție reprezintă, totodată și o metodă rapidă de izolare a pneumococului, înlocuind însămînțarea și izolarea pe medii de cultură.

Sputa se emulsionează în cîțiva ml soluție clorurosodică 8,5‰ sterilă, inoculîndu-se 0,5 ml subcutanat la baza cozii șoarecelui. Animalul moare în 24 — 48 de ore cu septicemie pneumococică. În caz că nu moare în acest interval de timp, se poate sacrifica șoarecele.

La autopsie se practică :

a) frotiuri prin impresiune din organele hematopoetice, splină şi ficat ;

b) însămînțări prin hemocultură, din inimă, pe medii speciale, bulion-ser, ascită, mediu *T*.

În frotiurile din organe, ca și în hemocultură, după colorație cu metoda Gram, se observă diplococi lanceolați, capsulați, gram-pozitivi.

Caracterele biochimice

Fermentarea inulinei. Pneumococul o fermentează în mediul Hiss (apă distilată două părți, ser de bou o parte, inulină 1% + tinctură de turnesol).

Pneumococul însămînțat produce, după 24 de ore la 37°, o înroşire a mediului, datorită virajului de culoare a turnesolului în mediul acid.

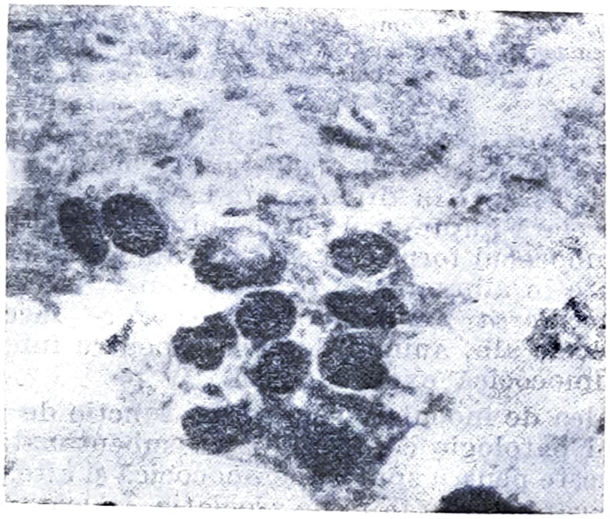


Fig. 294. — Diplococcus pneumoniae, frotiu din spută. Se vede imaginea negativă a capsulei (colorație Gram).

Deşi pneumococul fermentează o serie întreagă de carbohidrați, în practica diagnosticului de laborator se foloseşte numai testul fermentării inulinei, pentru a-l diferenția de streptococ, care nu o fermentează.

Fenomenul Neufeld reprezintă lizarea pneumococului de către bila de bou sau sărurile biliare. La o cultură proaspătă de pneumococ se adaugă bilă în proporție de 0,2 ml pentru 1 ml cultură în mediu lichid. În 15 — 20 de minute se observă limpezirea mediului, ceea ce denotă liza pneumococului. Menținerea la termostat accelerează liza pneumococului.

Testul sensibilității la optochin pentru diferențierea pneumococului de streptococi

Testul sensibilității la optochin (etil-hidrocuprein-hidroclorícum) reprezintă o metodă de diferențiere a pneumococului de streptococi în general şi de streptococul viridans în special. Testul poate înlocui pe acela al solubilității pneumococului în bilă şi sărurile biliare.

Testul cu optochin se efectuează astfel : se prepară rondele din hîrtie de filtru cu diametrul de 8 mm, care se sterilizează în cuptorul cu aer cald, 1 oră la 150°. Rondelele se impregnează cu o soluție de optochin în diluție de 1/4 000 în apă distilată sterilă şi se usucă într-o cutie Petri sterilă la termostat. Soluția de optochin se sterilizează în prealabil la autoclav, timp de 20 de minute la 110°.

Tulpina de testat, cultivată în bulion TIEM, se însămînțează cu o pipetă Pasteur pe suprafața unei plăci cu geloză-sînge de cal. Se înclină uşor cutia Petri şi excesul de cultură este absorbit cu o pipetă sterilă şi se îndepărtează. Plăcile se aşază la termostat cu capacul întredeschis, timp de 10 — 15 minute, apoi cu ajutorul unei pense sterile se depune, în centrul plăcii, o rondelă cu optochin. Se incubează timp de 20 — 24 de ore la 37° şi se citeşte diametrul zonei de inhibiție ce se dezvoltă în jurul rondelei.

Tulpinile de pneumococ prezintă o zonă de inhibiție care depăşeşte totdeauna 20 mm diametru. Tulpinile de streptococ viridans, β-hemolitic şi enterococ sînt, în general, rezistente la optochin sau prezintă o zonă de sensibilitate redusă care nu depăşeşte niciodată diametrul de 10 mm.

Elaborarea α-hemolizinei se manifestă prin producerea unei zone verzui de hemoliză incompletă în jurul coloniilor pe geloză-sînge.

Reacția de umflare a capsulei, descrisă de Neufeld, se poate încerca, atît pe produsul patologic, spută sau amprentă din splină, cît şi pe frotiurile din culturile de pneumococ în medii bogate în albumine.

Tehnica. Pe o lamă degresată se depune o picătură din cultura sau produsul patologic (de obicei spută) al cărui tip de pneumococ dorim să-l cunoaștem. Se adaugă o picătură din serul antipneumococic de tip, se amestecă și se examinează la microscop între lamă și lamelă. Este de preferat să se adauge o picătură de albastru de metilen, care ne ușurează observația, colorînd fondul preparatului și pneumococii.

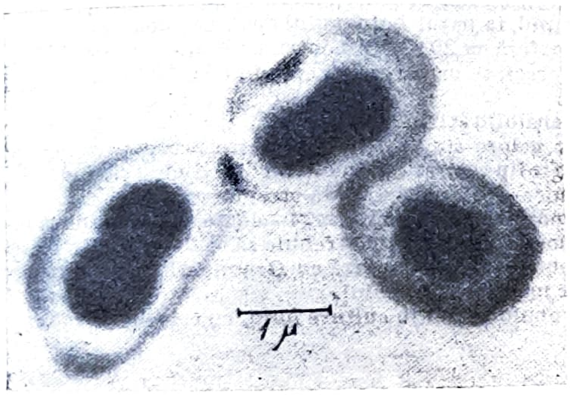


Fig. 295. — *Diplococcus pneumoniae*, fenomenul de umflare a capsulei Neufeld. Imagine electronică (× 13 000) (adaptare după Mudd).

Se observă microbii colorați în albastru, aglutinați și înconjurați de o zonă clară, mărită de 2—3 ori, care este capsula umflată. Pentru comparație se examinează și un frotiu, fără adaos de ser. Pentru ușurința tehnicii se fac amestecuri de 4—5 seruri antipneumococice de tip.

Mecanismul reacției se bazează pe specificitatea dintre antigenul capsular și serul specific anticapsular pneumococic.

Structura antigenică

Cercetările de imunochimie au făcut posibilă cunoașterea diferitelor fracțiuni antigenice ale pneumococului. Astfel s-au descoperit:

O substanță solubilă, specifică de tip de natură polizaharidică, care se găsește în capsula pneumococului și este socotită antigen incomplet sau «haptenă».

O substanță «C», o nucleoproteină avînd caracter de specie.

O nucleoproteină comună pneumococilor și streptococilor.

Reacția de precipitare se practică pentru identificarea tipului de pneumococ utilizînd ca antigen substanța solubilă specifică (*S.S.S.*) a microbului și seruri specifice de tip.

Reacția de aglutinare, mai rar întrebuințată, se efectuează ca orice alt test de aglutinare, cu antigen total și seruri specifice.

În mod practic se efectuează, pentru ușurința și rapiditatea unui diagnostic clinic, următoarele:

1. Frotiu direct, colorat Gram și albastru de metilen din produsul patologic și examen microscopic cu obiectivul de imersie. Se observă numeroși diplococi gram-pozitivi, capsulați, în diplo sau lanțuri de diplo, extra- și intracelulari în fagocitele polimorfonucleare, alături de floră banală și celule epiteliale de descuamare. În meningitele cu pneumococ se găsesc exclusiv diplococi intra- și extracelulari în frotiul direct din lichidul cefalorahidian.

2. Inocularea produsului patologic la șoarece. Inocularea se va face pe cale subcutanată, 0,5—1 ml de spută, sub pielea abdomenului, pentru că în produs există și floră de asociație. Organismul șoarecelui, extrem de sensibil la infecția pneumococică, se comportă ca un filtru selectiv față de pneumococ, care se generalizează rapid în organism pe cale sanguină, și animalul moare în 24—48 de ore, cu septicemie pneumococică. În cazul în care produsul patologic este monomicrobian, cum este cazul lichidului cefalorahidian, injectarea produsului se face în cantitate de 0,25—0,5 ml, direct intraperitoneal. Izolarea pneumococului de la șoarecele infectat se face după moartea animalului, prin hemocultură din inimă și constatarea prezenței microbului în cultură pură în frotiurile-amprente, pe care le efectuăm din organele bogat vascularizate (splină, ficat).

3. Identificarea pneumococului se poate face prin fenomenul de umflare a capsulei cu seruri anticapsulare de tip, direct cu produsul patologic — sputa bolnavului — sau, preferabil, pe frotiul-amprentă din splina șoarecelui infectat experimental.

Sensibilitate la antibiotice și chimioterapice.

Pneumococul este sensibil la toate antibioticele uzuale, penicilină, streptomicină și cicline. Este sensibil și la sulfamide. Există posibilitatea apariției de tulpini rezistente, mai ales în cazul meningitelor pneumococice; testarea sensibilității la antibiotice și chimioterapice pe medii cu sînge este obligatorie.

SCHEMA DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR ÎN INFECŢIILE PNEUMOCOCICE

Schema A

Produs patologic : lichid cefalorahidian (l.c.r.), exsudat pleural, peritoneal, exsudate purulente monomicrobiene etc.

- Frotiu direct din produs pe 2 lame. Coloraţie Gram şi albastru de metilen. Se urmăreşte prezenţa şi numărul diplococilor lanceolaţi, încapsulaţi gram-pozitiv şi a prezenţei fagocitozei.
- Însămînţări pe medii lichide şi solide complexe pentru obţinerea coloniilor izolate. În medii lichide : bulion-Truche, bulion-ascită, bulion glucozat ŢIEM etc. Pe medii solide : geloză-sînge, geloză-Truche, geloză-sînge glucozată, geloză-ascită etc. Pentru l.c.r. se va lua precauţiunea ca însămînţarea să se facă rapid, la patul bolnavului dacă se poate. Incubarea culturilor se face timp de 24—48 de ore la 37°, aerob şi eventual în atmosferă cu 20 % CO_2 pentru tulpinile microaerofile.
- Inocularea produsului patologic intraperitoneal la 2 şoareci albi. Şoarecii se urmăresc începînd de la 10 la 12 ore după inoculare.
- Din cultura în bulion se efectuează, după 18—22 de ore, testarea sensibilităţii la antibiotice.
- Se efectuează examenul macroscopic cu lupa a coloniilor izolate pe geloza-sînge şi se urmăreşte prezenţa zonei de α-hemoliză în jurul coloniilor. Se controlează morfologia germenului prin frotiu colorat Gram din mediul lichid şi solid.
- Din coloniile izolate se fac treceri pentru studiul caracterelor biochimice şi diferenţierea de streptococ.
- Se urmăreşte evoluţia infecţiei experimentale la şoarece. Animalele mor prin septicemie în 24—48 de ore. Din inima şoarecelui se face hemocultură pe bulion glucozat ŢIEM sau Truche. În hemocultura din inimă trebuie să se dezvolte, în interval de 18—24 de ore, cultură pură de pneumococ. Din splină se fac amprente care se colorează cu Gram şi albastru. Pneumococii se văd bine cu forma caracteristică, gram-pozitiv şi încapsulate la marginea frotiului.
- După 48 de ore, coroborînd datele examenului bacteriologic ale microbului izolat în cultură pură, cu cele ale infecţiei experimentale şi ale antibiogramei, se redactează buletinul de analiză.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECŢIILE PNEUMOCOCICE

Schema B

Produs patologic : spută, exsudate nazofaringiene, exsudate purulente etc., care conţin şi floră de asociaţie.

- Examinarea macroscopică a produsului patologic ; are semnificaţie mai mult pentru sputa ruginie din pneumonia pneumococică.
- Examen microscopic direct al produsului patologic prin 2 frotiuri colorate Gram şi albastru de metilen. Se urmăreşte prezenţa şi numărul diplococilor lanceolaţi, încapsulaţi gram-pozitiv, în comparaţie cu flora de asociaţie. Se urmăreşte prezenţa diplococilor fagocitaţi.
- Se fac însămînţări pe medii complexe solide, ca : geloză-sînge glucozată, geloză-Truche, geloză-ascită prin epuizarea ansei în striuri, spre a obţine colonii izolate.
- Se inoculează 0,5—1 ml de suspensie în ser fiziologic 8,5‰ din produsul patologic, pe cale subcutanată, la 2 şoareci albi.
- Se efectuează examenul macroscopic cu lupa al coloniilor izolate pe geloză-sînge şi se urmăreşte prezenţa zonei de α-hemoliză în jurul coloniilor. Se controlează morfologia microbilor prin frotiu colorat cu Gram.
- Din coloniile izolate caracteristice se fac treceri în bulion ŢIEM pentru antibiogramă şi pentru testele biochimice de diferenţiere cu streptococii.
- Se urmăreşte evoluţia infecţiei experimentale la şoarece. Animalele mor prin septicemie în 24—48 de ore şi se autopsiază imediat. Dacă se întîrzie autopsierea, ţesuturile şoarecelui sînt rapid invadate de flora de autoliză cadaverică. Din inima şoarecelui, se face hemocultură pe bulion glucozat ŢIEM sau Truche. În hemocultură din inima şoarecelui trebuie să se dezvolte în interval de 18—24 de ore cultură pură de pneumococ. Din splină se fac amprente care se colorează Gram şi albastru. Pneumococii se recunosc uşor după forma caracteristică, prezenţa capsulei şi coloraţia Gram-pozitiv. Microbii sînt deosebit de numeroşi la marginea frotiului prin amprentă.
- După 48 de ore, coroborînd datele examenului bacteriologic ale microbului izolat în cultură pură cu cele ale infecţiei experimentale şi ale antibiogramei, se redactează buletinul de analiză.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR PNEUMOCOCICE

Schema C

Produs patologic : sînge în cazurile de septicemie.

- Se extrag prin tehnica hemoculturii din venă de preferinţă prin metoda cu acul montat direct la recipientul cu bulion glucozat ŢIEM sau mediul Truche lichid.
- Se incubează la 37° în condiţii obişnuite sau preferabil în atmosferă de 10 % CO_2.
- Se urmăreşte zilnic timp de 10—14 zile, aspectul macroscopic al mediului. Prezenţa turbidităţii sau o uşoară modificare de culoare sînt indicaţii de creştere bacteriană. Indiferent de aspectul microscopic al mediului se fac zilnic treceri pe geloză înclinată sînge, se examinează o picătură de mediu între lamă şi lamelă şi pe un frotiu colorat Gram. Eventual se poate face simultan şi inocularea intraperitoneală a 0,5 ml la un şoarece alb.
- Se studiază cu lupa pentru alfa hemoliză coloniile izolate crescute pe geloză sînge, şi prin frotiu colorat Gram pentru prezenţa diplococilor lanceolaţi Gram pozitiv.

— Se fac subculturi din coloniile izolate caracteristice pe bulion glucozat ŢIEM sau bulion sînge pentru obţinerea culturii pure, studiul spectrului de sensibilitate la antibiotice, studiul caracterelor biochimice diferenţiale cu streptococii şi studiul infecţiei, experimentale prin inoculare a 0,5 ml cultură intraperitoneal la şoarecele alb.

— Se urmăresc în paralel şi şoarecii albi inoculaţi cu mediul de hemocultură şi se face eventual izolarea în cultură pură de la animal prin tehnica hemoculturii din cord.

— Se eliberează buletinul de analiză în care se arată caracteristicile tulpinii de pneumococ izolată prin hemocultură şi se indică spectrul sensibilităţii la antibiotice.

BIBLIOGRAFIE

BALDOVIN-AGAPI CORALIA, — Bacteriologie medicală, Sub. red. prof. N. Nestorescu, Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 372—380.

BELOIU IRINA, PLECIAŞ PAULA — Diagnosticul de laborator al infecţiilor produse de pneumococi, *Microbiologia, (Bucureşti)*, 1962, nr. 4, p. 369—375.

BOWERS E. F., JEFFRIES L. R. — Sensitivity to Optochin for the identification of the Pneumococcus, *J. Clin. Path.*, 1955, nr. 8, p. 58.

DUMAS J. — Bactériologie médicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 261—272.

FROBISHER M. — Fundamentals of bacteriology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Filadelfia, 1949, p. 540—545.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 356—372.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 71—80.

HODGES R. G., MC LEOD C.M. — Epidemic pneumococcal pneumonia. Final consideration of the factors underlying the epidemic, *Amer. J. Hyg.*, 1946, vol. 44, p. 237—243.

LUND ERNA — Laboratory diagnosis of pneumococcus infections, *Bull. O.M.S.*, 1960, vol. 23, nr. 1, p. 5—13.

MACKIE T. J., MC. CARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology. ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Londra, 1956, p. 355—361.

MC LEOD C. M., KRAUS M. R. — Relation of virulence of pneumococcal strains for mice to the quantity of capsular polysacharide formed in vitro, *J. Exp. Med.*, 1952, vol. 92, p. 1—9.

MC LEOD C. M. — The pneumococci. Din „Bacterial and mycotic infections of man" de René J. Dubos, ed. a 2-a, Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 244—264.

OSTROVSKAIA D. L. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase G. J. Sinai şi O. G. Birgher, (traducere din limba rusă), Ed. de Stat pentru literatura ştiinţifică, Bucureşti, 1952, p. 255—262.

SINYUSHINA M. N., GORBUNOVA K. P., ISAEVA L.A., SVETLOVA A. K., STAROVEROVA G. S., ELKINA S. I. — Studiu comparativ asupra microflorei în pneumoniile acute şi cronice la copii, *J.M.E.I.*, 1959, nr. 9, p. 67—71.

TOPLEY, and WILSON'S — Principles of bacteriology and immunity, ed. a 4-a, Ed. Edward Arnold, Londra, 1955, vol. I, p. 681—687; vol. II, p. 1 641.

VIGODCIKOV G. V. — Microbiologia pneumoniilor. *Vestn. Akad. Nauk. S.S.S.R.*, 1960, nr. 9, p. 3—10, din Probl. Pat. Inf. din literatura sovietică de specialitate, Acad. R.P.R., Inst. de Studii rom.-sov., 1961, 1, p. 56—68.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, p. 280—288.

ZINSSER H. — Textbook of bacteriology, ed. a 11-a, Ed. Aplleton-Century-Crofts, New York, 1957, p. 275—286.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR STREPTOCOCICE

Familia: *Lactobacteriaceae*. Genul: *Streptococcus*. Specia tip: *Streptococcus pyogenes*.

Generalităţi

După stafilococ, streptococul este microbul care determină cel mai frecvent inflamaţii şi infecţii piogene variate la om. Microbul a fost observat pentru prima dată de Pasteur, în 1878, în cazurile de septicemie puerperală şi a fost izolat de Fehleisen, în 1883.

Streptococul este foarte răspîndit în natură şi în cavităţile naturale ale omului şi animalelor, se găseşte pe piele, în căile respiratorii superioare şi în intestin. Multe specii sînt parazite comensale la om, altele sînt patogene. Omul poate fi purtător de streptococi patogeni. Există purtători sănătoşi, nazali şi faringieni de streptococ hemolitic.

Morfologie şi coloraţie

Streptococul este un microb de formă sferică sau ovalară, cu diametrul de 0,5—1 μ. Formele izolate sînt mai sferice, iar cele aşezate în lan-

Fig. 296. — Streptococcus pyogenes, frotiu dintr-o cultură în bulion (coloraţie Gram).

ţuri sînt mai alungite. Streptococii din infecţiile umane sînt gram-pozitivi în culturile tinere şi îşi pierd afinitatea de a reţine colorantul Gram în culturile vechi de cîteva zile. Sînt lipsiţi de spori şi imobili. Tulpinile virulente produc o capsulă care conţine acid hialuronic şi substanţa ,,M'', o proteină antigenică specifică de tip. Substanţa ,,M'' fiind situată la suprafaţa corpului microbian, protejează în acest fel microbul de acţiunea diastazelor fagocitelor.

Caractere de cultură

Streptococii patogeni cresc numai pe medii complexe în condiţii de aerobioză şi microaerofilie. Unele specii sînt anaerobe. Pentru izolare din produsul patologic, mediul trebuie să conţină fie sînge de iepure sau de cal, fie ser sau lichid de ascită. Adăugarea glucozei la aceste medii, în cantitate de 0,5—1%, măreşte capacitatea de creştere a streptococului, dar îi inhibă proprietatea de a liza hematiile; pH cel mai favorabil creşterii este în jurul a 7,4 — 7,6, iar temperatura optimă în jurul a 37°, pentru tulpinile patogene.

Streptococul fecal sau *enterococul* este singura specie care face excepţie, putîndu-se dezvolta la temperaturi de 43—47°.

În mediile lichide cu adaos de substanţe organice, bulion-ser, bulion-ascită, bulion-sînge sau bulion-glucozat se dezvoltă caracteristic, sub formă de depozit granular, care se depune pe pereţii şi fundul tubului de cultură, lăsînd mediul limpede. Bulionul-sînge este hemolizat.

Creşterea streptococilor este caracteristică pe mediile cu sînge, coloniile apar după 18—24 de ore de la însămînţare, sînt mici, rotunde cît o gămălie de ac, opalescente, de culoare cenuşie. În funcţie de faza de disociaţie microbiană apar 4 tipuri de colonii.

— Coloniile ,,matt'' sînt colonii rotunde, plate, cu marginile regulate, suprafaţa mamelonată şi deseori confluente, virulente.

— Coloniile ,,glossy'' sînt rotunde, lucioase, mici, cu suprafaţa conică, în formă de S, lipsite de virulenţă.

— Coloniile ,,mucoide'' rotunde, mari, convexe îşi datoresc aspectul mucos cantităţii mari de acid hialuronic, care alcătuieşte capsula bacteriană.

— Coloniile ,,rough'', uscate, cu margini neregulate, au virulenţă redusă. În general, coloniile ,,matt'' şi ,,mucoide'' conţin cantităţi mari de substanţă ,,M'' şi sînt virulente, pe cînd cele ,,glossy'' nu conţin proteina ,,M'' şi sînt avirulente.

Creşterea are loc în bune condiţii şi pe ser coagulat Löffler.

Caractere biochimice

Streptococul fermentează o serie de zaharuri simple, cu producere de acid, dar fără producere de gaze. Glucoza, de pildă, este fermentată şi descompusă în acid lactic şi cantităţi mici de acid formic, acetic şi alcool etilic. Fermentarea zaharurilor complexe, ca glicerolul, manitolul şi sorbitolul permite o diferenţiere a streptococilor între ei. Lipsa de fermentare a inulinei este folosită însă pentru diferenţierea cu pneumococul, care o fermentează. Lipsa de sensibilitate a streptococilor la acţiunea bilei şi sărurilor biliare este, de asemenea, folosită pentru diferenţierea biochimică de pneumococi.

Principala caracteristică biochimică a streptococilor, folosită în diagnosticul de laborator, este capacitatea de a hemoliza sîngele. Există 3 tipuri de comportare a streptococilor patogeni faţă de globulele roşii de iepure sau cal:

— *grupul streptococilor α-hemolitici*, care produc în jurul coloniilor o zonă de hemoliză incompletă, de culoare verzuie, după o coloraţie de 24 de ore la 37°. Au fost denumiţi, din aceste considerente, streptococi *viridans*. Dacă plăcile cu α-hemoliză le păstrăm încă 12 ore la gheţar, apare o zonă concentrică de hemoliză totală în jurul hemolizei de tip α, aşa-numita hemoliză de tip cald-rece;

— *grupul streptococilor β-hemolitici*, care produc în jurul coloniei o zonă de hemoliză totală după 24 de ore la 37°, care nu se modifică nici după păstrarea la gheţar;

— *grupul streptococilor anhemolitici sau cu comportare γ*, care nu hemolizează ţesutul sanguin. Majoritatea acestor streptococi sînt streptococi de origine intestinală şi au fost denumiţi enterococi sau streptococi fecali.

Comportarea streptococilor aerobi faţă de hematiile de cal şi iepure constituie un criteriu simplu de diferenţiere în cadrul grupurilor de streptococi patogeni pentru om. Diferenţieri mai amănunţite se pot face numai pe baza structurii antigenice. Toţi streptococii sînt aerobi şi anaerobi facultativ, dar anumite tulpini pot fi strict microaerofile sau anaerobe. Asemenea tulpini se întîlnesc în cazurile grave de septicemie puerperală şi septicemii; de asemenea au fost izolate din variate infecții supurative și gangrenoase.

De aceea este util, în cazul septicemiilor, să însămînțăm produsul patologic atît în condiții de aerobioză, cît și de microaerofilie și anaerobioză.

Rezistența streptococilor în mediul extern și față de agenții fizici și chimici este variabilă. Căldura la 55—60° îi omoară în 30 de minute. Frigul și uscăciunea îi conservă. Culturile de streptococ liofilizate se păstrează ani de zile. Antisepticele, ca fenolul 2%, sublimatul 1—2‰, apa oxigenată 3%, tinctura de iod etc., îi distrug în 5—10 minute. Sînt sensibili la acțiunea sulfamidelor, cu excepția enterococilor. Dacă dozele terapeutice sînt prea mici, se pot selecționa ușor tulpini sulfamidorezistente. Penicilina este foarte activă față de streptococii β-hemolitici. Streptococii *viridans* și enterococii sînt mai puțin sensibili la penicilină și streptomicină și necesită doze terapeutice mari sau asocierea a 2—3 antibiotice cu spectru de acțiune sinergic. Rezistența față de antibiotice poate să se instaleze cu ușurință. Streptococii anaerobi sînt insensibili la sulfamide și sînt tot așa de rezistenți la penicilină ca și streptococii *viridans*.

Structură antigenică

Cercetările îndelungate asupra structurii antigenice a streptococilor au îngăduit descoperirea a 3 fracțiuni antigenice de către Lancefield:

— Un carbohidrat legat de corpul bacterian, denumit *fracțiunea C*, este un polizaharid care imprimă specificitatea antigenică de grup streptococilor hemolitici. Cu ajutorul acestei fracțiuni C, Lancefield a clasificat streptococii patogeni în 13 grupuri serologice, notate cu majusculele alfabetului, de la A la N. În grupul A Lancefield intră aproape toți streptococii întîlniți în infecțiile umane. Celelalte grupuri interesează patologia animală.

— Cea de-a doua fracțiune antigenică este o proteină acidosolubilă, situată la suprafața bacteriilor, denumită fracțiune M. Această fracțiune proteică M conferă o specificitate de tip streptococilor. Lucrările lui Griffith au individualizat, pînă în prezent, 50 de tipuri serologice de streptococi prin reacții de aglutinare pe lamă.

— Cea de a treia fracțiune antigenică decelată la streptococii aerobi este fracțiunea P, o proteină nespecifică, comună și altor specii microbiene.

În diagnosticul de laborator al infecțiilor streptococice folosim determinarea serologică a antigenelor de grup, prin intermediul reacției de precipitare cu polizaharidul C, după tehnica Lancefield, și mai rar, în caz de anchete epidemiologice, se utilizează reacția de aglutinare pe lamă după Griffith, pentru identificarea serologică a antigenelor fracțiunii M specifice de tip.

Metaboliții bacterieni

Streptococii pot elabora o serie de metaboliți celulari, care posedă uneori o capacitate toxică ridicată față de organismul uman și față de animalele de laborator.

Pînă în prezent s-au identificat, în filtratele culturilor de streptococi piogeni în medii lichide, 8 componente cu acțiune toxică asupra țesuturilor: toxina eritrogenă, hemolizina sau streptolizina O și S, fibrinolizina sau streptokinaza, proteinaza, ribonucleaza, dezoxiribonucleaza sau leucocidina, hialuronidaza. După Van Heyningen, ele se grupează, după felul acțiunii lor, în:

a) substanțe care atacă constituenții sîngelui: hemolizina, leucocidina, fibrinolizina;

b) substanțe care măresc permeabilitatea țesuturilor (hialuronidaza);

c) enzime proteolitice.

Principala toxină streptococică este considerată toxina eritrogenă; celelalte componente de natură enzimatică sînt socotite mai mult toxine accesorii; ele nu exercită constant un efect letal, dar contribuie la realizarea caracterului complex de virulență și patogenitate al streptococului.

Toxina eritrogenă, eritrotoxina, toxina scarlatinoasă sau toxina Dick, inoculată sub piele la indivizii susceptibili, provoacă simptomele toxice ale scarlatinei, manifestate prin greață, vărsături, tulburări nervoase și eritem sau *rash* scarlatinos, erupție cutanată caracteristică. În faza acută a bolii, toxina se găsește în sîngele și urina bolnavilor. Inoculată intradermic, în anumită cantitate, provoacă o zonă de roșeață la indivizii sensibili (reacția Dick). Este antigenică, producînd formarea de antitoxină în organism; sub acțiunea formolului și a temperaturii se transformă în anatoxină. Acțiunea toxinei este neutralizată *in vivo* și *in vitro* de către antitoxină. Erupția scarlatinoasă păleşte, iar fenomenele generale de ordin toxic sînt amendate, sub influenţa serului antitoxic sau a serului de convalescent de scarlatină. Potenţa toxinei eritrogene se exprimă în doze reacţionale cutanate. O doză reacţională cutanată (S.T.D.) (*Skin test dosis* = unitate test cutanată) este cantitatea minimă de toxină care, injectată pe cale intradermică la persoane sensibile, produce o zonă de roşeaţă cu un diametru de cel puţin 10 mm.

Hemolizinele sau streptolizinele. Todd a stabilit că în filtratele culturilor de streptococi există două componente care manifestă proprietăţi hemolitice: *Streptolizina O*, sensibilă la acţiunea oxigenului, şi *Streptolizina S*, rezistentă la acţiunea agenţilor oxidanţi. Aceste 2 streptolizine se deosebesc fundamental, deşi ambele lizează globulele roşii ale diferitelor specii animale. Streptolizina O este o hemolizină oxigenolabilă, activă numai în forma redusă şi inhibată de colesterol. Manifestă, alături de acţiunea hemolitică, şi o acţiune cardiotoxică şi letală. Este antigenică şi provoacă apariţia antistreptolizinelor O, care sînt anticorpi neutralizanţi, atît în serul animalelor inoculate experimental, cît şi în serul bolnavilor cu afecţiuni streptococice. Antistreptolizina neutralizează streptolizina O, atît în faza oxidată, cît şi în faza redusă. Streptolizina S se deosebeşte mult de O, pe de o parte, prin faptul că este rezistentă la acţiunea oxigenului, iar pe de altă parte, pentru că nu este antigenică. Streptolizina S este foarte toxică pentru animale; moartea survine în 24—48 de ore, prin hemoliză intravasculară şi degenerescenţa parenchimatoasă a organelor. Titrarea antistreptolizinelor O a devenit o metodă practică de diagnostic al infecţiilor streptococice umane.

Fibrinolizina sau streptokinaza. Tillet a arătat că streptococii hemolitici din produsele patologice ale omului sînt capabili să lizeze cheagul de fibrină umană. Ulterior s-a constatat că factorul activ din filtratele de streptococi este o kinază, prin care acţionează factorul litic al serului; de aici numele de streptokinază sau fibrinolizină. Streptokinaza este antigenică. Streptokinaza apare în serul bolnavilor cu afecţiuni streptococice; titrarea antistreptokinazelor în ser poate fi folosită ca metodă de diagnostic de laborator.

Nucleazele (ribonucleaza şi dezoxiribonucleaza) sînt secretate în cantităţi însemnate de streptococii grupului A Lancefield. Dezoxiribonucleaza are capacitatea de a scinda proteinele dezoxiribozice din exsudatele patologice şi, prin acelaşi mecanism, acţionează ca o leucocidină asupra leucocitelor. Dezoxiribonucleaza este antigenică şi a fost încercată în terapeutică sub denumirea de streptodornază.

Proteinaza este o enzimă de tipul papainei şi catepsinelor, capabilă să digere substanţe variate, printre care streptokinaza, fibrina, laptele şi cazeina, ca şi substanţa M.

Sistemul acid hialuronic-hialuronidază. Streptococii virulenţi posedă o capsulă, care îi face nefagocitabili şi care se pierde repede pe mediile de cultură. Capsula streptococilor este alcătuită din acid hialuronic. Capsula este prezentă la majoritatea streptococilor din grupurile A şi C. Ea nu poate fi pusă în evidenţă decît în culturile tinere, deoarece streptococii secretă, în acelaşi timp, o altă enzimă, hialuronidaza, capabilă să distrugă capsula. Hialuronidaza streptococică acţionează rapid asupra capsulei streptococilor şi de aceea capsula nu este vizibilă decît în culturile tinere, cînd hialuronidaza nu a fost încă elaborată. Hialuronidaza este antigenică. Antihialuronidaza poate fi decelată în serurile bolnavilor cu infecţii streptococice.

Infecţia experimentală

Dintre animalele de laborator, cele mai sensibile sînt iepurele şi şoarecele. Inocularea iepurelui subcutanat, cu o cultură virulentă de streptococ, la baza urechii, provoacă apariţia unui erizipel. Injectarea intraperitoneal sau intravenos de toxină eritrogenă la iepure îl omoară repede.

Animalul de laborator care se pretează cel mai bine pentru infecţii experimentale este şoarecele alb. Cantitatea de cultură care constituie inoculul are o deosebită importanţă în reuşita infecţiei experimentale. Se foloseşte pentru inocul o cultură pe agar-sînge de 18—20 de ore, din care se încarcă o ansă cu ochiul de 2 mm Ø şi se face o suspensie în 2 ml bulion-ser. Din această suspensie se inoculează 0,2 ml intraperitoneal la şoarece de 20 g. Animalele fac, în majoritatea cazurilor, o septicemie mortală cu streptococ. Injectarea culturii pe cale subcutanată determină în majoritatea cazurilor infecţii localizate. Tulpinile foarte virulente pot determina septicemii şi pe această cale. Cobaii şi şobolanii sînt mai puţin sensibili la infecţia experimentală, iar celelalte animale sînt în general refractare la tulpinile de streptococ de origine umană.

Boala la om

Omul este deosebit de susceptibil la infecţiile streptococice. Streptococul este patogen prin virulenţa şi puterea toxigenă; el provoacă la om infecţii cu caracter inflamator, supurativ sau toxic, cu manifestări clinice variate în raport cu capacitatea de invazie a microbului şi cu capacitatea sa de toxigeneză.

Streptococul piogen ca şi stafilococul, este un microb care se poate localiza în orice ţesut sau organ, determinînd infecţii variate, ca:

— erizipel sau inflamaţia dermului;

— piodermite, pemfigus la nou-născut, ectima;

— abcese, flegmoane cu caracter de expansiune;

— angină streptococică cu aspect pultaceu, flegmonos, pseudomembranos, uneori cu caracter epidemic;

— scarlatină produsă de toxina eritrogenă a streptococului hemolitic, probabil asociat cu un virus;

— febră puerperală sau septicemie puerperală;

— pleurezii, peritonite, meningite, artrite;

— sinuzite, otite, mastoidite, infecţii de focar.

— boala reumatismală are în antecedente infecţii cu streptococ: angine, scarlatină, infecţii dentare sau alte infecţii de focar;

— infecţiile streptococice ale tubului digestiv de tip toxiinfecţie alimentară, provocate de streptococi din grupul D Lancefield, printre care cel mai frecvent, enterococul.

Endocardita lentă malignă (boala Osler) sau *endocardita subacută* bacteriană apare cînd o bacterie cu virulenţă scăzută, ca streptococul viridans, sau enterococul, se localizează pe valvulele inimii lezate congenital, sau în urma unui reumatism acut. Peste 50% din cazuri sînt datorite streptococului *viridans*, restul, enterococului, unor streptococi anaerobi sau altor germeni. Bacteriile se localizează în cutele adînci ale ţesutului de granulaţie nevascularizat şi de aceea sînt greu accesibili antibioticului. Dozele bacteriostatice obişnuite de penicilină sînt insuficiente. De aceea se folosesc doze mari, peste 20 milioane de unităţi pe zi, în asociere cu alte antibiotice. Concentraţiile de penicilină în sînge trebuie să fie de 4-5 ori mai mari ca doza bactericidă *in vitro*.

Diagnosticul de laborator

Dintre streptococii care interesează patologia umană, mai importanţi sînt: streptococul piogen, hemolitic, streptococul viridans şi enterococul. Etapele diagnosticului bacteriologic al unei infecţii streptococice sînt următoarele:

— recoltarea produsului patologic în funcţie de forma clinică şi localizarea infecţiei;

— examenul microscopic în frotiu direct;

— însămînţarea şi izolarea microbului pe medii cu sînge;

— studiul caracterelor morfologice, tinctoriale şi de cultură ale microbului izolat în cultură pură;

— teste biochimice pentru diferenţierea streptococului, de pneumococ şi enterococ;

— studiul structurii antigenice de grup şi de tip cu imunoseruri precipitante şi aglutinante;

— în completarea diagnosticului de laborator se face testarea sensibilităţii la sulfamide şi antibiotice mai ales cînd este vorba de tulpini de streptococ *viridans* şi enterococ;

— se mai pot efectua teste suplimentare, ca realizarea infecţiei experimentale la şoarece sau iepure şi evidenţierea caracterelor de toxinogeneză ale tulpinii izolate;

— în afecţiunile reumatice cu antecedente de infecţii streptococice se practică titrarea antistreptolizinelor O în serul bolnavilor.

Recoltarea produselor patologice. Produsele patologice sînt numeroase, datorită numeroaselor forme de infecţie streptococică: puroi, exsudat amigdalian, faringian şi nazal, spută, lichid cefalorahidian, exsudat pleural, secreţie vaginală şi a colului uterin, urină, sînge, alimente, material necropsic. În erizipel se recoltează, cu pipeta Pasteur, din serozitatea veziculelor de la marginea leziunii. În abcese şi flegmoane se recoltează exsudat purulent prin puncţie sterilă cu seringa, în cazul colecţiilor închise, şi cu pipeta Pasteur, cu un tampon steril sau cu ansa de platină, în cazul leziunilor supurative deschise. În anginele bănuite streptococice, ca şi la acei suspectaţi de a fi purtători de streptococ hemolitic, se recoltează exsudatul amigdalian sau faringian cu un tampon steril.

În infecţiile *post partum*, secreţiile serosanguinolente uterine se recoltează cu o pipetă sterilă sau cu un tampon steril. În endocardita lentă şi în septicemii se recoltează sînge prin tehnica hemoculturii, fie sînge venos, prin puncția venelor de la plica cotului, fie sînge arterial, prin arteriocultură din artera femurală. În mediul folosit pentru hemocultură trebuie să luăm precauția de a neutraliza efectele sulfamidelor prin adaos de acid paraaminobenzoic și ale penicilinei prin penicilinază, în cazul că bolnavul de la care facem recolta se află sub tratament.

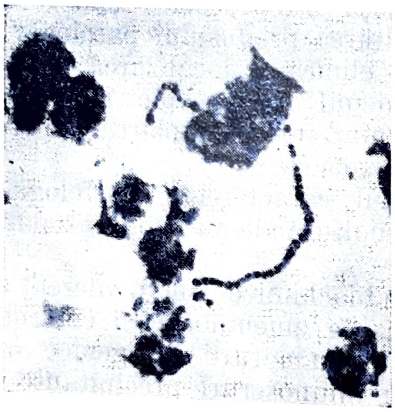


Fig. 297. — Streptococcus pyogenes, frotiu din puroi (colorație Gram).

În infecțiile căilor urinare se recoltează aseptic urina și se examinează sedimentul obținut prin centrifugare.

În infecțiile seroaselor, ca meningite, artrite, pleurezii etc., se recoltează prin puncție sterilă lichid cefalorahidian, exsudat articular sau pleural.

Produsele patologice de la cadavre: se recoltează sînge după prealabilă cauterizare a inimii cu o spatulă înroșită în flacăra becului de gaz și apoi se puncționează inima cu o pipetă Pasteur sau o seringă sterilă și se aspiră sîngele.

Examenul microscopic în frotiu direct se face prin întinderea pe lamă a produsului patologic într-un frotiu subțire, care se colorează cu albastru de metilen și Gram. El are în general o valoare orientativă și se urmărește prezența cocilor gram-pozitivi și a polimorfonuclearelor, neutrofile, eventual și prezența cocilor fagocitați intraleucocitari. Pentru unele produse patologice, cum este cazul lichidului cefalorahidian, examenul microscopic direct are o valoare mai mare și prezența, în sedimentul obținut după centrifugarea lichidului cefalorahidian a numeroase leucocite polimorfonucleare cu coci intracelulari gram-pozitiv este un semn sigur de infecție.

În cazul sedimentului urinar, examenul microscopic direct are o valoare orientativă. Eventuala prezență a leucocitelor polimorfonucleare cu coci intracelulari gram-pozitiv este și aici un indiciu cert de infecție.

Însămînțarea și izolarea microbilor din produsele patologice ne permite obținerea coloniilor izolate ale agentului cauzal și, deci, obținerea lui în cultură pură. Pentru streptococ, însămînțarea și izolarea se fac, obișnuit, pe medii complexe cu adaos de sînge, ser, ascită. În mediile lichide, ca bulion glucozat cu ser, ascită sau sînge, se dezvoltă caracteristic manifestînd o creștere granulară pe fundul și pereții tubului de cultură, lăsînd mediul limpede. Este un tip de creștere caracteristic al coloniilor R în mediile lichide. În însămînțările pentru decelarea purtătorilor de streptococ se folosește uneori și mediul de îmbogățire Pike, care datorită cristal violetului și azoturii de Na, inhibează flora de asociere din rinofaringe. Din mediul de îmbogățire se fac după 18 — 20 de ore dispersii pe plăci cu geloză-sînge. Pe mediile solide dezvoltă colonii mici pulverulente, opace, bine delimitate, cu zonă de hemoliză în jur. Din coloniile izolate se fac frotiuri și treceri pe bulion glucozat, pentru a obține creșterea tipică în lanțuri, și pe geloză-sînge de cal sau de iepure, pentru a stabili tipul de colonie și de hemoliză. Pe plăcile de geloză-sînge, coloniile de streptococi apar după 18 — 24 de ore, sînt mici cît o gămălie de ac, transparente sau translucide, cu o zonă de hemoliză în jur. Streptococul piogen dezvoltă o zonă de β-hemoliză, hemoliză totală de 3 — 5 ori mai mare decît diametrul coloniei. Streptococul *viridans* dezvoltă o zonă de α-hemoliză de nuanță verzuie. Diferențierea de alți microbi hemolitici ca stafilococul se face prin aspectul coloniei, care la stafilococ este mai mare, opacă și pigmentată. Pentru alți microbi hemolitici, ca, *Hemophilus*, *Corynebacterium*, *Cl. welchii* sau colibacilul, este necesară și efectuarea unui frotiu din colonie.

Teste biochimice și biologice pentru diferențiere de pneumococ:

— Streptococul nu fermentează inulina	— Pneumococul fermentează inulina
— Streptococul nu este lizat de bilă și sărurile biliare	— Pneumococul este lizat de sărurile biliare și bilă
— Streptococul inoculat subcutanat la șoarecele alb nu produce septicemie, ci infecție localizată	— Pneumococul inoculat subcutanat la șoarecele alb produce constant o septicemie mortală în 24—48 de ore

Diferențierea de enterococ se realizează astfel :

— Streptococul nu reduce albastrul de metilen în lapte	— Enterococul reduce albastrul de metilen și decolorează laptele
— Streptococul este inhibat pe mediile cu bilă și săruri biliare	— Enterococul reduce albastrul de metilen și decolorează laptele
	— Enterococul se dezvoltă bine în mediile de cultură, cu adaos de bilă sau săruri biliare în proporție de 10—40%
— Streptococul este omorît la temperatura de 60°	— Enterococul rezistă bine la 60°
— Streptococul nu se dezvoltă pe medii hipercclorurate alcaline	— Enterococul se dezvoltă în medii cu conținut de 6,5% ClNa și la pH de 9,6

Completarea diagnosticului se efectuează prin identificarea serologică de grup după tehnica Lancefield și testarea sensibilității la chimioterapice și antibiotice.

Streptococii β-hemolitici sînt în general foarte sensibili la penicilină și sulfamide și în practică deseori nici nu se mai face testarea sensibilității *in vitro*. Cînd este vorba de streptococii din grupul *viridans* și enterococi, testarea sensibilității *in vitro* pe medii cu sînge este obligatorie și este bine să folosim un lot mare de antibiotice, pentru a putea alege și asocia eventual pe cele mai eficace. În cazul testării sensibilității la sulfamide este necesar să folsim hematii lizate de cal în proporție finală de 5% pentru a elimina substanțele antagoniste sulfamidelor.

Diagnosticul de laborator al scarlatinei

În diagnosticul de laborator al scarlatinei urmărim, pe de o parte izolarea și identificarea microbului prin metode bacteriologice, iar pe de altă parte evidențierea stării imunologice a bolnavului, prin intermediul reacției de neutralizare a toxinei eritrogene.

A. **Metoda bacteriologică** constă în recoltarea exsudatului amigdalian și faringian cu ajutorul unui tampon steril și însămînțarea lui pe o placă cu geloză-sînge. Vom lua precauția să descărcăm tamponul pe direcția unei 1/2 diametru al plăcii cu mediu și apoi, cu ajutorul unei baghete de sticlă sterile în formă de L, întindem, printr-o mișcare circulară, inoculul, într-un strat uniform, pe toată suprafața plăcii. După 24 de ore la 37° vor apărea colonii mici, izolate cu zonă de β-hemoliză în jur. Din aceste colonii β-hemolitice caracteristice se fac treceri pe bulion glucozat și bulion-sînge. Apoi se fac frotiuri colorate Gram din bulion și vom constata coci tipici, în lanțuri lungi, streptococi. Pentru a-i deosebi de pneumococi, facem o nouă trecere pe o placă cu sînge și controlăm tipul de hemoliză în cultură pură. Pneumococul dă o hemoliză de tip *viridans*. Ne putem ajuta și de testele biochimice și de structură antigenică dacă dorim să obținem date suplimentare.

Diagnosticul serologic

Identificarea serologică a unei tulpini de streptococ pentru a stabili dacă face parte din grupul A Lancefield este folosită cu precădere în investigațiile epidemiologice. Determinarea serologică de grup este în practică suficientă pentru a putea stabili dacă un purtător de streptococ trebuie menținut izolat și supus tratamentului de sterilizare.

În diagnosticul bacteriologic de spital al unui caz izolat de infecție streptococică interesează mai mult identificarea speciei de streptococ și mai puțin grupul serologic.

Singura metodă serologică pentru decelarea anticorpilor antistreptococici care s-a impus în mod curent în practică este determinarea titrului antistreptolizinelor O în ser.

I. **Determinarea serologică de grup.** Serurile antistreptococice precipitante de grup sînt seruri de iepure, obținute prin imunizarea animalelor cu antigen streptococic de grup A, C și G.

Ele se întrebuințează pentru identificarea grupului serologic al streptococilor hemolitici. Identificarea comportă precipitarea extractelor din cultura de cercetat conținînd substanța hidrocarbonată C Lancefield, specifică de grup, în prezența serurilor specifice.

Identificarea serologică de grup a streptococilor hemolitici servește, în anchetele epidemiologice, la diferențierea streptococilor de grup A Lancefield, care interesează patologia umană.

Tehnica reacției constă în următoarele: *Prepararea extractelor streptococice după metoda Lancefield.* Tulpina de streptococ hemolitic se însămînțează în tuburi conținînd 10 — 15 ml bulion glucozat 2% și se incubează 18 — 24 de ore la 37°.

Cultura este centrifugată 10 minute la 2 000 de ture, pentru îndepărtarea lichidului supernatant. La sedimentul de cultură obținut se adaugă 0,5 ml soluție acid clorhidric N/5 în ser fiziologic. Tuburile cu sedimentul acidificat se pun în apă care fierbe și se țin 10 minute. Se răcesc apoi la apă curentă, se centrifughează și lichidul se decantează într-un tub de hemoliză. Se adaugă o picătură dintr-o soluție alcoolică de albastru de bromtimol 0,2%. Apoi se neutralizează, adăugînd picătură cu picătură dintr-o soluție de hidrat de sodiu N/5, și se agită mereu, pînă la apariția unei culori verzi, care indică pH între 7,0 și 7,2. Se centrifughează și se decantează cu grijă supernatantul, care reprezintă extractul solubilizat al antigenului de grup al streptococilor.

Reacția de precipitare se poate efectua, fie în tuburi, fie în pipete capilare.

Precipitarea în tuburi. Extractul streptococic se repartizează cîte 0,2 ml în 3 tuburi speciale de precipitare, cu diametrul interior de 4—6 mm.

În primul tub se adaugă 0,1 ml ser precipitant antigrup A, lăsîndu-l să alunece cu grijă de-a lungul peretelui tubului. În celelalte 2 tuburi se pune cîte 0,1 ml ser precipitant antigrup C și G.

După 15 — 20 de minute se notează apariția inelului de precipitare la interlinia de separare dintre extract și ser.

După citire, tuburile se agită și se mențin la termostat la 37° timp de 2 ore. Se păstrează în continuare o noapte la ghețar, la + 4°. Citirea finală se face după 24 de ore. Precipitatul depus la fundul tuburilor se desprinde prin agitare. Notarea se face după cantitatea de precipitat și după mărimea grunjilor (+, ++, +++, ++++).

Precipitarea în tuburi capilare. Sînt necesare tuburi capilare cu un diametru interior de 0,7 — 1 mm și o lungime de 75 — 100 mm, preparate din partea efilată a pipetelor Pasteur.

Se absoarbe prin capilaritate o coloană de ser de 2—3 ml. Se înmoaie vîrful tubului în extract, lăsînd să pătrundă o coloană de aceeași înălțime. Tubul se implantează în plastilină, cu coloana de ser deasupra. Citirea se face după 15 — 20 de minute, cînd se observă apariția inelului de precipitare. Se menține 2 ore la termostat, apoi o noapte la ghețar. Citire finală: precipitatul este depus la partea inferioară a coloanei de lichid, și eventual pe pereții tubului.

Tulpinile de streptococ hemolitic, ale căror extracte nu au precipitat în prezența nici unuia din cele 3 seruri, aparțin altor grupuri serologice.

II. Determinarea serologică de tip. Tulpinile de streptococ care aparțin grupului A pot fi mai bine individualizate din punctul de vedere al structurii antigenice prin determinarea tipului serologic prin metoda aglutinării pe lamă, după Griffith. Pentru aceasta sînt necesare culturi omogene ale tulpinii de cercetat, care se realizează prin treceri succesive pe bulion-tripsină. După 3 — 4 treceri succesive se aruncă lichidul de cultură și depozitul microbian se folosește ca antigen în reacția de aglutinare pe lamă. Se folosește o pipetă Pasteur fin efilată, cu ajutorul căreia se pun pe lamă 5 picături egale de depozit microbian. Lama se așază sub o lupă, care mărește de 20 × și se adaugă cu o ansă fină de platină cîte o picătură din ser aglutinant specific de tip. Se amestecă și reacția de aglutinare apare imediat. Deoarece există în prezent 47 de tipuri în grupul A, pentru ușurarea lucrului se pot folosi amestecuri de cîte 5 — 6 seruri de tip, grupate în cîteva serii și dacă aglutinarea s-a produs cu un astfel de amestec, reluăm aglutinările pe lamă individual cu serurile din amestec, stabilind astfel tipul serologic de streptococ.

III. Determinarea grupului A Lancefield prin testul cu bacitracină. Streptococii grupului A Lancefield sînt inhibați selectiv de bacitracină. Această caracteristică poate fi folosită practic la diferențierea rapidă a streptococilor de grup A de ceilalți streptococi.

Pentru testul cu bacitracină se folosesc rondele din hîrtie de filtru de 6,5 mm sterilizate, prin căldură uscată, o oră la 150°. Rondelele se impregnează apoi într-o soluție cu 5 unități de bacitracină pe ml și se lasă să se usuce într-o cutie Petri sterilă, la termostat. Rondelele impregnate se pot păstra în eprubete sterile, închise cu dop de cauciuc sau cu dop de tifon acoperit cu leucoplast, în frigider la — 2°, timp de 3 săptămîni.

Testul se execută astfel: din cultura pură de streptococ în bulion se fac însămînțări cu ansa în striuri dese, pe suprafața unei treimi dintr-o placă Petri cu geloză-sînge de oaie. Astfel, într-o placă se pot testa simultan 3 tulpini. După însămînțare, așezăm în centrul sectorului însămînțat cîte o rondelă cu bacitracină.

Placa Petri se incubează 18 — 24 de ore la 37°. Toate tulpinile de streptococ din grupul A Lancefield sînt inhibate de bacitracină. În mod cu totul excepţional se întîlnesc tulpini de streptococ din grupul A care sînt rezistente la bacitracină. De asemenea, excepţional se întîlnesc tulpini de streptococ sensibile la bacitracină care să facă parte din celelalte grupuri serologice Lancefield.

Posibilităţile de eroare ale testului cu bacitracină nu sînt mai mari decît cele întîlnite cu prilejul testării serologice de grup şi poate fi folosit în practică cu rezultate foarte bune pentru determinarea grupului, mai ales la tulpinile tipice de streptococ β-hemolitic.

IV. **Decelarea antistreptolizinei O.** *Metoda Rantz şi Randall.* Pentru practicarea reacţiei de titrare a antistreptolizinei *O* sînt necesare: 1) serurile de cercetat; 2) lizină *O* parţial purificată şi concentrată; 3) eritrocite proaspete de iepure; 4) soluţii tampon pentru diluţii; 5) antistreptolizină *O* standard.

Doza-test de streptolizină *O* este unitatea combinantă, adică acea cantitate de lizină care neutralizează 1 unitate standard de antistreptolizină *O*. Înainte de practicarea reacţiei propriu-zise, se determină unitatea combinantă a lizinei.

Determinarea unităţii de combinare. Determinarea proprietăţii antigenice şi hemolitice a lizinei concentrate implică reducerea ei în momentul întrebuinţării. Reducerea se face cu o soluţie de cisteină clorhidrică, preparată în momentul titrării. Cantitatea de 0,15 g cisteină se dizolvă în 25 ml soluţie tampon cu următoarea compoziţie:

NaCl	4,2	g
KH_2PO_4	3,17	g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	3,58	g
Apă distilată	1 000	ml

La această soluţie tampon cu pH = 6,5 se adaugă 1,6 g NaOH. Pentru a determina unitatea de combinare, lizina se diluează 1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/12 şi se repartizează, din fiecare diluţie în tuburi de hemoliză, următoarele cantităţi:

ml lizină diluată:	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10
ml tampon-cisteină:	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40

Tuburile se lasă pe masă timp de 10 minute, pentru reducere. Se adaugă apoi în fiecare tub cîte 1 ml din antistreptolizină standard diluată în aşa fel încît să conţină 1 unitate/ml. Se agită, se ţine în baie de apă la 37°, timp de 15 minute. Se adaugă la fiecare tub cîte 0,5 ml dintr-o suspensie 5% de globule roşii de iepure, proaspăt recoltate, care au fost în prealabil spălate şi readuse la volumul iniţial. Se agită bine, se lasă 45 de minute la baia de apă la 37° după care se face citirea.

Cantitatea de lizină care nu mai produce hemoliză reprezintă unitatea de combinare sau unitatea combinantă.

Determinarea titrului antistreptolizinei O în serurile de cercetat. Toate serurile de cercetat recoltate steril, indiferent de vechime sau de vîrsta pacientului, se inactivează 30 de minute la 56°. Se fac din aceste seruri diluţiile 1/10, 1/100, 1/500 din care se repartizează în tuburi de hemoliză după tabelul 112.

TABELUL 112

Cercetarea titrului ASLO în serul sanguin

Diluţiile de ser	1/10	1/100	1/500
Ser de cercetat (ml)	0,8 ; 0,2	1,0 ; 0,8 ; 0,6 ; 0,4 ; 0,3	1,0 ; 0,8 ; 0,6 ; 0,4 ; 0,2
Ser fiziologic (ml)	0,2 ; 0,8	0,0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,7	0,0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8
Lizina redusă	Se adaugă 0,5 ml în fiecare tub		
Se menţine 15 minute la baia de 37°			
Eritocite de iepure 5%	Se adaugă 0,5 ml în fiecare tub		
Se menţine încă 45 de minute la baia de 37°			
Titrul reacţiei în unităţi ASLO	15 ; 50	100 ; 125 ; 166 ; 250 ; 333	500 ; 625 ; 833 ; 1250 ; 2500

Lizina se diluează în momentul întrebuinţării, conform titrului stabilit în prealabil. În reacţie se utilizează, pentru fiecare tub, o unitate combinantă completată pînă la 0,50 ml cu soluţie tampon-cisteină. Presupunînd că unitatea combinantă este de 0,15 din diluţia 1/8, este necesar ca fiecare tub să conţină 0,15 ml lizină diluată 1/8 şi 0,35 ml cisteină-tampon. Amestecul lizină-cisteină se lasă în contact timp de 10 minute înainte de repartizare şi poate fi utilizat numai timp de o oră din momentul preparării.

Drept control în reacţie, se adaugă două seruri cu titrul de antistreptolizină cunoscut, unul cu titru crescut şi altul cu un titru scăzut.

Titrul de antistreptolizină *O* (ASLO) este dat de ultimul tub, în care nu se mai produce hemoliză.

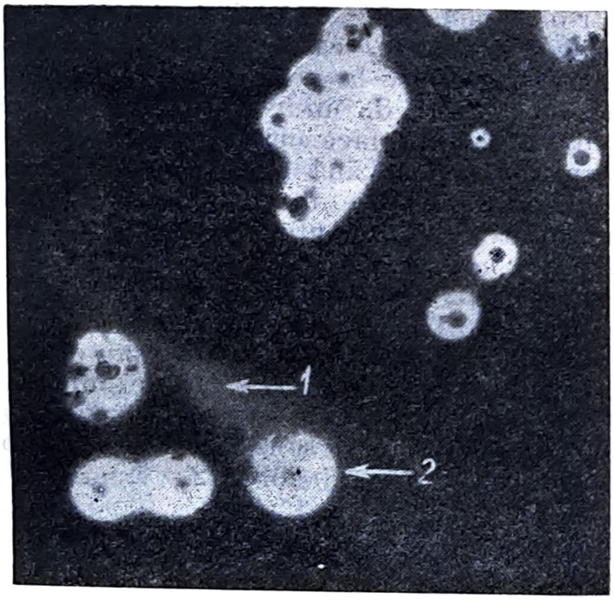


Fig. 298. — Zonă de α- şi β-hemoliză la streptococii hemolitici. Cultură de 24 de ore pe geloză-sînge (colecţia autorului).

Decelarea unui titru ridicat de antistreptolizine *O* în serurile umane constituie o dovadă de infecţie cu un streptococ din grupul A. Pentru interpretarea rezultatelor, se va ţine seama de titrurile normale de antistreptolizină *O*. Prezenţa acestui anticorp în serul indivizilor sănătoşi este datorită infecţiilor streptococice cu evoluţie subclinică. Starea de purtător sănătos cu prezenţa streptococilor hemolitici în rinofaringe şi amigdale sau trecerea unei populaţii printr-o infecţie epidemică streptococică are drept urmare creşterea titrului în antistreptolizină *O*. În ţările din zona temperată majoritatea adulţilor prezintă titruri normale, pînă la 200 u./ml. Baldovin şi colaboratorii în 1955 au stabilit aceeaşi limită normală a titrului de antistreptolizine *O* pînă la 200 unităţi pe ml, pentru ţara noastră.

Imunitatea în infecţiile streptococice este relativă, din cauza multiplelor tipuri de streptococi existenţi. Imunitatea antibacteriană se pune în evidenţă prin prezenţa anticorpilor specifici: aglutinine şi precipitine. Imunitatea antitoxică faţă de toxinele streptococice se consideră că este durabilă şi se pune în evidenţă prin reacţia Dick, fenomenul de stingere şi titrarea antistreptolizinei *O* în serul bolnavilor.

Faptul că scarlatina este singura infecţie streptococică urmată de rezistenţă durabilă, deşi streptococii nu dau o asemenea imunitate, constituie un argument că scarlatina este probabil datorită unei asociaţii, ,,virus-streptococ'' (Cantacuzino).

Metoda imunologică. Folosim 2 metode de aplicare practică a reacţiei antigen-anticorp de neutralizare *in vivo* a toxinei eritrogene de antitoxina corespunzătoare:

a) Fenomenul de stingere Schultz-Charlton.
b) Intradermoreacţia Dick.

Fenomenul de stingere Schultz-Charlton se poate folosi în două feluri: direct şi indirect.

Metoda directă constă în injectarea intradermică la bolnavul suspect de scarlatină, în plină zonă eruptivă, de ser de convalescent de scarlatină în cantitate de 0,1 sau 0,2 ml.

Dacă eritemul devine palid în zona injectată şi se stinge erupţia, bolnavul are scarlatină. Există deci o reacţie pozitivă specifică de neutralizare între anticorpii antitoxici din serul de convalescent şi eritrotoxina care a produs erupţia scarlatinoasă.

Metoda indirectă: se injectează intradermic 0,1 ml din serul unui bolnav sau convalescent suspect de scarlatină, în plină zonă eruptivă, la un bolnav sigur scarlatinos. Reacţia are valoare din a 18-a zi de boală, cînd anticorpii neutralizaţi sînt dezvoltaţi la bolnav. În cazul că serul suspect produce stingerea erupţiei, el provine de la un scarlatinos. Metoda ne poate ajuta astfel să facem un diagnostic retrospectiv în cazurile uşoare sau fruste de boală în care nu avem certitudinea că a fost scarlatină.

Reacţia Dick este testul prin care se depistează susceptibilitatea indivizilor la scarlatină; se întrebuinţează toxina scarlatinoasă Dick în diluţii, astfel ca 0,1 sau 0,2 ml dintr-un ml să conţină o unitate cutanată = *Skin test dosis* (S.T.D.). Ca martor se foloseşte aceeaşi toxină inactivată prin căldură la 80°, timp de o oră. Tehnica reacţiei Dick se realizează prin injectare intradermic, pe faţa anterioară a antebraţului drept, a 0,1 —0,2 ml toxină Dick. La antebraţul celălalt se injectează aceeaşi cantitate de toxină inactivată prin căldură, toxina martor. Citirea reacţiei se face la 24 de ore. Pentru interpretare se pot lua în discuţie următoarele alternative:

— *reacţie pozitivă*: apare o zonă de roşeaţă de 10—15 mm, după 18—22 de ore, la locul de inoculare, iar la antebraţul martor nici o reacţie;

— *reacţie negativă*: nici o modificare la ambele antebraţe;

— *pseudoreacţie negativă*: apare zona de roşeaţă la ambele antebraţe şi dispare în 24 de ore la ambele antebraţe; denotă o sensibilizare a organismului la proteinele streptococice;

— *reacţie pozitivă combinată*: zona de roşeaţă apare la ambele antebraţe şi dispare după 24 de ore la martor. Pentru evitarea pseudoreacţiilor se folosesc astăzi preparate purificate de toxină eritrogenă Dick.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU STREPTOCOC

Schema A

Produs patologic (puroi, exsudat pleural, spută, lohii, lichid cefalorahidian, urină)

↓

- Însămînţare în suprafaţă şi profunzime pe plăci cu geloză-sînge prin metoda diseminării.
- Se incubează aerob şi anaerob la 37°. (Unele produse patologice, ca: lichidul cefalorahidian, exsudatul pleural, urina sînt în prealabil centrifugate şi însămînţările se fac din sediment).
- Se observă cu lupa caracterul coloniilor şi tipul hemolizei.
- Se selecţionează cîteva colonii caracteristice şi se recoltează colonia cu vîrful ascuţit al ansei de platină şi se însămînţează într-un mediu lichid (bulion glucozat, bulion-ser etc.).
- Se controlează puritatea culturii şi morfologia caracteristică a microbilor prin frotiuri colorate Gram.
- Se fac treceri pe o nouă placă de geloză-sînge, în striuri paralele, pentru confirmarea hemolizei în cultură pură.
- Se fac treceri pentru:
  1. Determinarea hemolizei în medii lichide.
  2. Determinările serologice de grup.
  3. Determinările biochimice suplimentare pentru diferenţiere de enterococ şi pneumococ.
  4. Eventual testarea sensibilităţii la antibiotice.
  5. Se fac eventual subculturi în bulion-sînge, mediul pentru păstrarea tulpinilor de streptococ în laborator.
- Se eliberează buletinul de analiză, în care se arată indicaţiile examenului microscopic direct şi caracteristicile tulpinii de streptococ izolat în cultură pură. Eventual se indică sensibilitatea *in vitro* la antibiotice.

↓

— Frotiu direct din produs sau din sediment, colorat Gram şi albastru pentru examen citobacterian.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU STREPTOCOC

Schema B

Produs patologic: lapte contaminat, incriminat în transmiterea anginelor streptococice de origine alimentară

- Probele de lapte presupus contaminat cu streptococ se centrifughează steril timp de 30 de minute, la 3 000 t/min. Cu o pipetă Pasteur se recoltează o porţiune din supernatant, apoi se goleşte tubul de centrifugă şi se amestecă conţinutul pipetei cu sedimentul şi se însămînţează în patru plăci cu geloză-sînge, 2 în suprafaţă şi 2 în profunzime. Se incubează cîte 2 plăci aerob şi anaerob la 37°.
- Se efectuează 2 frotiuri din sediment, se lasă să se usuce, se fixează prin flambare, apoi se degresează cu alcool sau xilol timp de 1—2 minute şi se colorează cu Gram şi albastru Loeffler pentru examen citobacterian. Într-un lapte normal la examenul microscopic al sedimentului se văd foarte rare leucocite şi epitelii plate, foarte rare microorganisme. Streptococii apar sub forma de coci Gram pozitiv în perechi sau lanţuri scurte.
- După 24—48 de ore coloniile hemolitice de pe geloză se trec pentru obţinerea culturii pure şi se continuă diagnosticul după schema A.

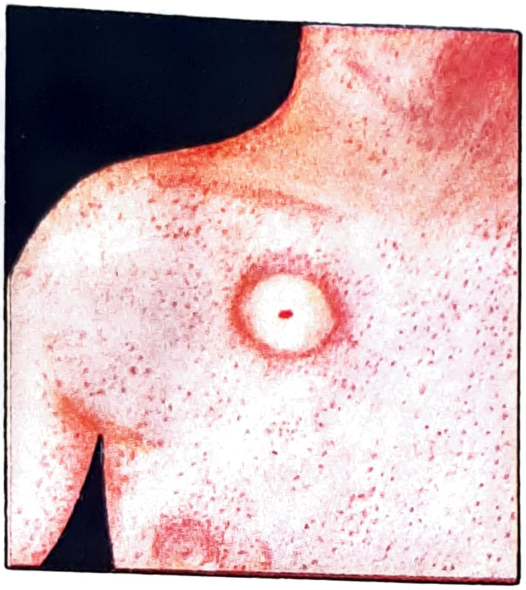


Fig. 299. — Fenomenul de stingere Schultz-Charlton (adaptare după Kolmer).

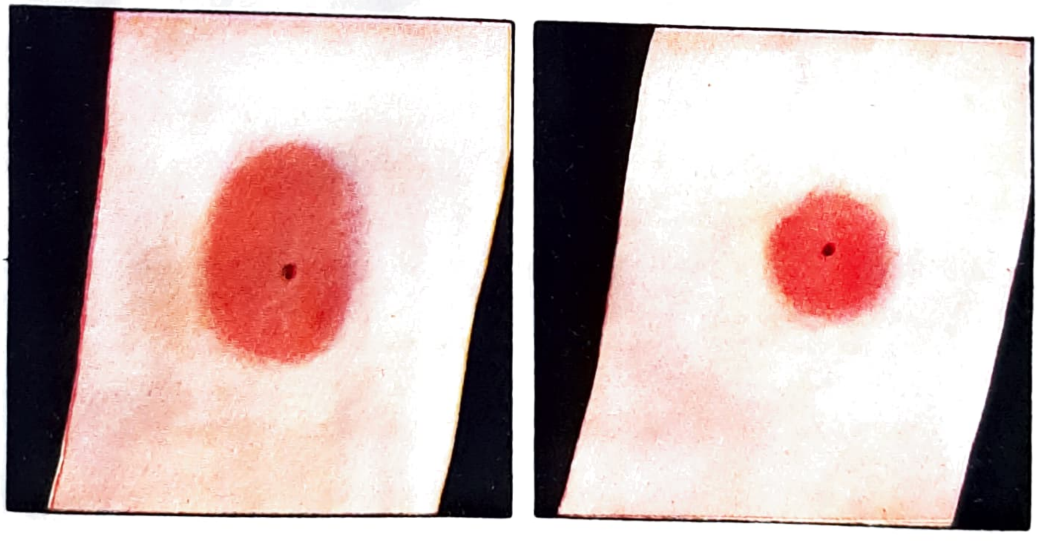


Fig. 300. — Intradermoreacţia Dick. Stînga : reacţie intens pozitivă, după 24 de ore ; dreapta : reacţie slab pozitivă după 24 de ore.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU STREPTOCOC

Schema C

Produs patologic (sînge din hemocultură în cazurile suspecte de endocardită în septicemii)

Se extrag prin tehnica hemoculturii, din venă sau arteră, 20 ml sînge şi se repartizează :

↓ 10 ml se amestecă cu 10 ml dintr-o soluţie sterilă 2% citrat de Na ↓

↓ 3 ml ↓ 3 ml ↓ 3 ml

în 3 balonaşe cu 50 ml bulion glucozat $2^{0}/_{00}$ sau bulion-ser şi se incubează la 37°, aerob, anaerob şi în atmosferă de 10% CO_2.

- Se repartizează cîte 2 ml sînge citratat în 5 plăci Petri şi se adaugă 7–10 ml geloză sînge, răcită la 45–48°. Se amestecă şi se solidifică. Restul de sînge citratat se repartizează cîte 3 ml în 3 balonaşe cu bulion glucozat. Plăcile şi balonaşele se incubează : anaerob = o placă şi un balonaş ; aerob = 2 plăci şi un balonaş ; în atmosferă de CO_2 = 2 plăci şi un balonaş.
- Culturile se controlează prin treceri pe geloză sînge şi frotiu la 48 de ore, 7, 10 şi 14 zile. Se consideră negative după 14 zile. ←
- În caz de creştere se continuă studiul culturii pure ca la schema A.
- Se eliberează buletinul de analiză în care se arată caracteristicile tulpinii de streptococ izolată în cultură pură din sînge şi se indică spectrul de sensibilitate *in vitro* la antibiotice.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU STREPTOCOC

Schema D

Produs patologic : exsudat rinofaringian pentru diagnosticul anginelor şi purtătorilor

- Se fac însămînţări directe cu tamponul cu exsudat, prin mişcări de şerpuire pe direcţia razei unei plăci Petri cu geloză-sînge. Apoi se face dispersia inoculului pe toată suprafaţa plăcii, cu ajutorul unei baghete de sticlă în L, rotind placa Petri.
- Se fac însămînţări cu tamponul cu exsudat în mediul de îmbogăţire Pike.
- Se observă cu lupa caracterul coloniilor izolate şi tipul hemolizei, se selecţionează cîteva colonii caracteristice.
- Se fac subculturi din aceste colonii prin recoltarea lor pe vîrful ascuţit al ansei de platină şi însămînţare în medii lichide : bulion glucozat, bulion-ser sau bulion-sînge.
- Se fac însămînţări din mediul de îmbogăţire Pike pe plăci cu geloză-sînge prin metoda epuizării ansei în striuri paralele. Trecerile din mediul de îmbogăţire se fac numai în cazul cînd însămînţările directe pe geloză-sînge nu au îngăduit obţinerea unor colonii caracteristice.
- Se controlează puritatea culturii în mediul lichid şi morfologia caracteristică a streptococilor prin frotiuri colorate Gram (coci Gram-pozitivi în lanţuri lungi).
- Se fac treceri pe o nouă placă de sînge prin metoda epuizării ansei în striuri paralele pentru confirmarea hemolizei în cultură pură.
- Se fac însămînţări din cultura pură în mediul lichid pentru determinarea spectrului de sensibilitate la antibiotice pe plăci cu geloză-sînge şi pentru determinările biochimice suplimentare pentru diferenţiere cu enterococul şi pneumococul.
- Se eliberează buletinul de analiză în care se arată caracteristicile tulpinii de streptococ izolată în cultură pură şi se indică eventual spectrul sensibilităţii *in vitro* la antibiotice.

BIBLIOGRAFIE

BALDOVIN C., BUŞILĂ V. T., VASILESCU I., SZABO M., SON C., BERCOVICI I. — L'immunité dans la scarlatine traitée par la penicilline. I. La capacité d'extinction des sérums (phenomène indirect de Schultz-Charlton), *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 1957, vol. 16, p. 105.

BALDOVIN C., DIMITRIU C., BUŞILĂ V. T., FRANCHE M., MIHALCU FL. — L'immunité dans la scarlatine traitée par la penicilline. II. L'antistreptolizine „O", *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 1957, vol. 16, p. 279.

BALDOVIN C. — AGAPI, NESTORESCU N. — Bacteriologie medicală (sub. red. prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 352–371.

BALDOVIN C. — AGAPI, MIHALCU FL. — Considérations sur les épidemies streptococciques d'origine alimentaire, *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 1961, vol. 20, p. 191.

BALDOVIN C. — Scarlatina, Ed. medicală, Bucureşti, 1952.

GASTINEL P. — Précis de Bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 326–355.

GLESSI B. E., EDELMAN S. — Lucrările Institutului „Mecinikov", Kiev, 1952.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 47.

HOLLINGER N. F. — Antistreptolysin O serum levels. Their determination and use as a diagnostic aid with particular reference to active rheumatic fever in children, *Amer. J. Publ. Hlth.*, 1953, vol. 43, p. 561.

IENIȘTEA C. — Microbiologia alimentelor, Ed. medicală București, 1958, p. 126—168.

LIAMPERT I. M., BORDIJUNK N. A., AGABABOVA E. R., SCEGLOVA A. S., BOLOTINA A. J., JAREȘKO N. T. — Antigene streptococice la bolnavii de reumatism în variate faze ale bolii, *J.M.E.I.*, 1961, nr. 10, p. 58—64.

MACKIE J. T., CARTNEY E. J. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinbourgh, 1956, p. 329.

MIHALCU F., NEGRU F. — Contribuții la studiul unui mediu de îmbogățire pentru izolarea streptococilor hemolitici, *Mirrobiologia (București)*, 1956, nr. 2, p. 92—94.

MIHALCU FL. — Diagnosticul de laborator al infecțiilor streptococice, *Microbiologia (București)*, 1962, nr. 4, p. 357.

KLODNIȚSKAIA S. N. — Hemoculturile la copii în faza activă a reumatismului, *J.M.E.I.*, 1961, vol. 11, p. 56—60.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approved Laboratory Technic, ed. a IV-a, Appleton-Century, New-York, 1945, p. 425—429.

PIKE R. M. — The isolation of hemolitic streptococci from throat swabs. Experiments with sodium azide and crystal violet in enrichment broth., *Amer. J. Hyg.*, 1945, vol. 41, p. 211.

RANTZ L. A., Di CAPRIO J. N., RANDALL E. — Antistreptolysin O and antihyaluronidase titers in health and in various diseases, *Amer. J. med. Sci.*, 1952, vol. 224, p. 194.

VÎDOGCIKOV G. V., RAVICI-BIRGHER E. D. — Infecții cu streptococ. Din Sinai și Birgher. Diagnosticul microbiologic al bolilor infecțioase, Ed. științifică, București, 1952, p. 203.

VOICULESCU M. și colaboratorii — Boli infecțioase, vol. II, Ed. medicală, București, 1960, p. 926.

WAHL R., HEYER P. — Milieux de culture et méthodes d'isolement pour les streptocoques et les pneumocoques, *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, vol. 92, p. 43.

WHITOY L., HYNES M. — Medical Bacteriology, ed. a VI-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 142—172.

WILLIAMS R.E.O. — Laboratory diagnosis of streptococcal infections, *Bull. O.M.S. Maladies transmissibles*, 1958, vol. 19, p. 153.

WILSON G. S., MILES A. A. — Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, ed. a IV-a, Ed. Arnold, Londra, 1955, p. 1 657—678.

WILDFUHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, p. 258—280.

ZINSSER H. — Bacteriology, ed. a 11-a, Appleton-Century, New York, 1957, p. 252—274.

BALDOVIN-AGAPI CORALIA, MIHALCU FLORICA, BORȘAI LEA, BULBUC ANA — Sensibilitatea la penicilină a streptococilor piogeni grup A, *Microbiologia (București)*, 1961, nr. 5, p. 413—420.

LEVINSON M. L., FRANCK P. F. — Bacitracin test for the identification of Group A streptococci, *J. Bact.*, 1955, vol. 69, p. 284—287.

BALDOVIN-AGAPI CORALIA, MIHALCU FLORICA, BORȘAI LEA — Metodele de identificare rapidă a streptococilor hemolitici grup A, *Microbiologia (București)*, 1961, 6, p. 543—548.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE NEISSERII

Familia: *Neisseriaceae*. Genul: *Neisseria*

Generalități

Genul Neisseria cuprinde coci ovalari așezați în perechi, în formă de bob de cafea (reniformi), cu fețele turtite privindu-se față în față, gram-negativ strict paraziți. Unele specii sînt strict patogene pentru om.

Dintre neisseriile care produc afecțiuni la om cele mai importante sînt:

Meningococul — *Neisseria meningitidis.*

Gonococul — *Neisseria gonorrhoeae.*

Alți microbi din genul *Neisseria*, mai puțin importanți, de obicei pigmentați, care totuși pot deveni patogeni, singuri sau în asociație, sînt: *Neisseria* sau *Micrococcus catarrhalis*, *Neisseria flava*, *Neisseria faringis*, *Diplococcus mucosus*, *Diplococcus crassus*, *Neisseria flavescens* etc. Sînt semnalate unele forme benigne de meningită cu unii din acești microbi.

NEISSERIA INTRACELLULARIS MENINGITIDIS

Meningococul se găsește în nazofaringe la indivizii sănătoși și bolnavi constituind izvorul de infecție (purtători sănătoși).

Are o rezistență foarte scăzută față de agenții fizici și chimici. În afara organismului, meningococul moare în cîteva ore; de aceea produsele patologice trebuie transportate cu grijă și foarte rapid la laborator.

Meningococul este foarte sensibil la toate dezinfectantele. Fenolul 1% distruge menigococul într-un minut; sublimatul 1‰, instantaneu. La uscăciune, moare în 1—2 ore. Liofilizarea îl conservă ani îndelungați.

Agent patogen al meningitei cerebrospinale epidemice, boală care poate fi însoțită de septicemii și sindroame purpurice, meningococul poate provoca simple rinofaringite.

Produsele patologice sînt reprezentate de lichidul cefalorahidian, de exsudatul faringian și de sînge. Recoltarea lichidului cefalorahidian se face prin puncție lombară sau suboccipitală, după tehnica puncției rahidiene. Exsudatul faringian se prelevează cu ajutorul unui tampon steril în cazurile de rinofaringită și de la purtători, în mediu epidemic.

În caz de septicemii, se recoltează sînge pentru hemoculturi după tehnica cunoscută.

Meningococul este sensibil la sulfamide și antibiotice. Sulfatiazolul, sulfadiazina și paraaminofenilsulfamida sînt deosebit de eficiente *per os.* Datorită penicilinei, meningitele meningococice se vindecă în cîteva zile. Tetraciclinele au şi ele o acţiune netă şi rapidă în meningita meningococică. În mediu epidemic, chimioprofilaxia cu sulfamide sau penicilină realizează sterilizarea purtătorilor de meningococ şi stăvileşte epidemia.

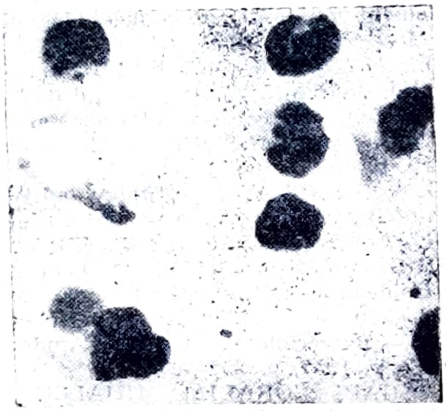


Fig. 301. — *Neisseria meningitidis*, frotiu din lichidul cefalorahidian. Se văd diplococi fagocitaţi de leucocite şi extracelulari (coloraţie Gram).

Diagnosticul de laborator

Produsul patologic într-o meningită cerebrospinală poate fi reprezentat de exsudatul faringian, sînge şi lichidul cefalorahidian.

Meningita cerebrospinală este precedată întotdeauna de o rinofaringită mai mult sau mai puţin pronunţată, datorită prezenţei pe mucoasele rinofarinxului a *Neisseriei meningitidis*, în tot timpul fazei acute a infecţiei.

Pentru diagnosticul de laborator la bolnav cercetarea prezenţei meningococului prin examenul exsudatului nu prezintă importanţă practică datorită dificultăţii de a-l izola şi deosebi de celelalte neisserii din flora de asociaţie a rinofarinxului.

Infecţia meningococică se asociază şi cu prezenţa microbului în sînge, producînd-se astfel septicemii care pot lua o evoluţie foarte gravă, complicîndu-se cu fenomene hemoragice.

Cercetarea sîngelui prin hemocultură se face recoltînd minimum 20 ml sînge după tehnica cu acul montat la balonul cu mediu. Ca mediu de cultură se foloseşte bulionul glucozat cu ascită şi adaos de penicilinază sau acid paraaminobenzoic, în caz că s-a recoltat după începerea tratamentului antiinfecţios. Hemocultura se incubează la 37° în atmosferă cu adaos de 10% CO_2 şi se controlează zilnic prin subculturi pe geloză-sînge timp de 10 zile. Coloniile izolate se trec în subculturi pe medii cu sînge pentru obţinerea culturii pure şi pe geloză obişnuită pentru diferenţiere de alte neisserii. Tulpina izolată se identifică pe baza reacţiilor biochimice şi prin aglutinare cu serurile antimeningococice de tip.

Principalul produs patologic pentru diagnosticul meningitei cerebrospinale este lichidul cefalorahidian, recoltat prin puncţie lombară sau suboccipitală. Deoarece meningococii sînt foarte susceptibili la variaţiile de temperatură trebuie ca operaţiile de diagnostic să se efectueze foarte rapid şi să se lucreze cu sticlărie şi medii de cultură încălzită în prealabil la 37°. Lichidul cefalorahidian recoltat steril se examinează macroscopic; el este de obicei opalescent sau purulent. O parte din lichid se transvazează în 2 tuburi de centrifugă sterile şi se centrifughează la maximum 1 000 de ture, timp de 10—15 minute. Dacă lichidul este net purulent se poate renunţa la centrifugare. În răstimpul centrifugării se face numărătoarea elementelor celulare în camera Fuchs-Rosenthal sau Nageotte. În cazul lichidului net purulent acesta va fi diluat în prealabil 1/10—1/20 în ser fiziologic 8,5‰ steril. Dintr-un tub al sedimentului de centrifugare se efectuează însămînţări prin epuizarea ansei pe cîte 2 plăci cu geloză-sînge glucozată sau geloză-şocolat; se incubează la 37° în atmosferă obişnuită o placă, iar cea de a 2-a în atmosferă cu adaos de 10% CO_2.

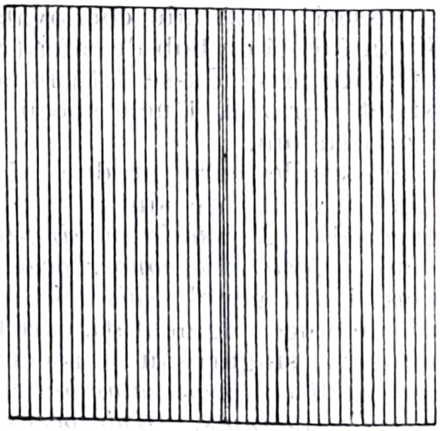


Fig. 302. — Celula Nageotte.

Din cel de-al 2-lea tub de centrifugare se recoltează cu o pipetă Pasteur fin efilată sedimentul și se depune cîte o picătură pe 3 lame noi, curate și degresate. Picăturile se întind cu ajutorul unei lamele sau lame ca un frotiu de sînge și se colorează cu colorația Giemsa pentru citologie, cu Gram și cu albastru de metilen pentru fagocitoză. Într-o meningită acută purulentă întîlnim totdeauna o pleocitoză intensă care depășește 1 000 de elemente celulare pe mm³, iar în formula citologică predomină net granulocitele neutrofile cu nucleu polimorf intacte sau alterate. Pe frotiurile colorate cu Gram și albastru de metilen se observă numeroși diplococi reniformi gram-negativi intra- și extracelulari, ceea ce constituie o imagine caracteristică pentru meninogococ. După 24 de ore de incubație se controlează aspectul coloniilor pe cele 2 plăci. Coloniile de meningococ sînt rotunde, mici, convexe, albe-cenușii, lucioase. După 24 de ore își dublează diametrul și ajung la 2-3 mm, iar după 3—4 zile se transformă în colonii „R" și devin opace cu margini neregulate.

Coloniile izolate se controlează prin frotiu colorat Gram și se subcultivă pentru a obține tulpina în cultură pură. Subculturile se controlează prin frotiuri colorate cu Gram pentru puritate și se fac apoi însămînțări pentru cercetarea spectrului de fermentație a zaharurilor pentru efectuarea reacției peroxidazelor, pentru identificarea serologică prin reacții de aglutinare și precipitare pentru testarea sensibilității la antibiotice și sulfamide și eventual proba patogenității la șoarece.

1. Determinarea spectrului fermentativ pe următoarele zaharuri: glucoză, maltoză și levuloză.

Meningococul fermentează, fără formare de gaze, glucoza și maltoza. Redăm caracteristicile fermentative a 3 specii de *Neisseria* mai des întîlnite:

	Glucoză	*Maltoză*	*Levuloză*
meningococ	+	+	—
gonococ	+	—	—
micrococ catarал	—	—	—

2. Reacția oxidazelor găsește o aplicare la diferențierea coloniilor de meningococ.

Tehnica. Cu ajutorul unei anse bacteriologice se ia o picătură din soluție 1% de dimetil-parafenilen-diamină hidroclorică și se depune peste colonia suspectă din placa însămînțată. În 6—10 minute coloniile de *Neisseria* se colorează în roșu deschis, apoi purpuriu și negru. Reacția nu este specifică numai pentru speciile *Neisseria*, dar caracteristică și acestor bacterii.

3. Reacția de aglutinare se efectuează cu o suspensie în ser fiziologic 8,5‰ steril din cultura de meningococ de 24 de ore cu o densitate de 1 miliard de bacterii pe ml. Se efectuează diluții cu cele 4 seruri de tip A, B, C, și D de la 1/25 pînă la titrul serului indicat pe fiolă. Într-o serie de tuburi de aglutinare sterile se repartizează cîte 0,5 ml din fiecare diluție de ser antimeningococic și se adaugă cîte 0,5 ml suspensie microbiană de cercetat. Citirea se face după incubare de 2 ore la 37°. Seria de tuburi în care se produce aglutinarea la titrul cel mai înalt ne indică tipul meningococului izolat. Tipizarea meningococului are importanță practică la purtători în cursul unei meningite epidemice.

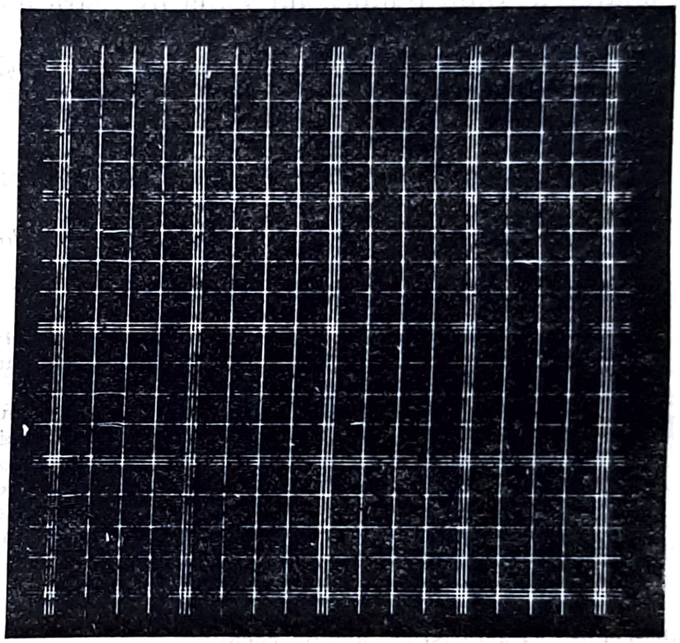


Fig. 303. — Celula Fuchs-Rosenthal.

4. Reacția de precipitare. În cursul meningitei cerebrospinale, sedimentul lichidului cefalorahidian, obținut prin centrifugare, conține fracțiuni antigenice solubile, cu proprietăți precipitante. Acest sediment, pus în contact cu serurile antimeningococice de tip A, B, C și D în tuburi speciale de precipitare, produce, la linia de separare a lichidelor, un inel albicios de precipitare cu serul corespunzător tipului de meningococ.

5. Testarea sensibilității la antibiotice și sulfamide se face prin folosirea metodei difuzimetrice calitative cu pulberi de antibiotice pe

plăci cu agar sînge. Pentru sulfamide se va folosi mediul Lund (bulion-agar 2%, fără peptonă cu adaos de sînge de cal lacat în proporție de 10%, turnat în plăci Petri) în vederea înlăturii factorilor antisulfamidici.

6. Patogenitatea la animal se apreciază cu oarecare dificultate, datorită adaptării parazitare stricte a meningococului la specia umană. De aceea se folosește, pentru a facilita realizarea infecției experimentale, asocierea la inoculul bacterian a mucinei sau gălbenușului de ou, substanțe care blochează reacția fagocitară a animalului. Dăm tehnica lui Zaharov, care folosește gălbenuș de ou recoltat steril, ce se amestecă într-un mojar cu 5 ml ser sau ascită și 1 ml soluție sterilă de glucoză 10%. După amestecare se efectuează controlul sterilității prin însămînțare pe 1 tub de geloză înclinată și un tub de bulion. În momentul întrebuințării se încălzește amestecul de gălbenuș la 37°. Se efectuează de asemenea în soluție clorurosodică 8,5‰ sterilă, încălzită la 37°, o suspensie din cultura de meningococ de cercetat. Se aspiră într-o seringă sterilă încălzită la 37°, 0,9 ml gălbenuș de ou și 0,1 ml din suspensia de meningococ și se inoculează intraperitoneal la un șoarece alb. Meningococii se înmulțesc rapid în peritoneul șoarecelui și de obicei în 24 de ore animalul moare prin septicemie. Meningococul poate fi izolat în cultură pură prin tehnica hemoculturii din inimă sau din exsudatul peritoneal, înainte de moartea animalului.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL MENINGITEI MENINGOCOCICE

Schema A

Produs patologic: lichid cefalorahidian (l.c.r.), exsudat faringian

— Recoltarea l.c.r. prin puncție lombară, suboccipitală.
— Examen macroscopic rapid: lichid opalescent sau purulent net.
— Centrifugare în 2 tuburi sterile, timp de 10—15′ la 1 000 turații/min.
— Numărătoarea elementelor în celula Nageotte sau Fuchs-Rosenthal.
— Efectuarea însămînțărilor din sediment prin epuizarea ansei pe două plăci cu geloză-sînge sau geloză-șocolat. (Atenție, însămînțările se practică numai pe medii încălzite în prealabil la 37°.) Incubarea plăcilor la 37° în atmosferă obișnuită și cu adaos de 10% CO_2.
— Efectuarea din sediment a 3 frotiuri colorate cu Giemsa, Gram și albastru pentru citologie, floră și fagocitoză.

În primele ore după recoltare se poate elibera un buletin provizoriu care indică prezența exclusivă în frotiurile din sediment a diplococilor gram-negativ reniformi, intra- și extracelulari însoțiți de o pleiocitoză și formulă citologică ce caracterizează o meningită acută purulentă.

— Examenul macroscopic cu lupa al plăcilor cu geloză-sînge pentru apariția coloniilor mici, rotunde, convexe, lucioase, albe-cenușii caracteristice meningococului.

— Din coloniile izolate tipice, controlate prin frotiu colorat cu Gram, se fac subculturi pe geloză-sînge și geloză înclinată obișnuită pentru a obține tulpina în cultură pură și a o diferenția de speciile Neisseria ce cresc pe medii uzuale.

— Se controlează subculturile prin frotiu colorat Gram pentru puritate și se efectuează următoarele teste necesare identificării tulpinii izolate:

- ↓ Determinarea spectrului fermentativ la glucoză, maltoză și levuloză
- ↓ Efectuarea reacției oxidazelor
- ↓ Testarea sensibilității la antibiotice prin metoda difuzimetrică pe agar-sînge
- ↓ Identificarea serologică de tip prin reacția de aglutinare în tuburi
- ↓ Identificarea serologică prin reacție de precipitare în inel cu serurile precipitante antimeningococice
- ↓ Testul de patogenitate pe șoarecele alb

Se eliberează buletinul definitiv, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, biochimice, antigenice, de patogenitate și sensibilitate la antibiotice ale tulpinii de meningococ izolate.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL SEPTICEMIEI CU MENINGOCOC

Schema B

Produs patologic: sînge

— Recoltarea sîngelui în cantitate de 20 ml, după tehnica hemoculturii cu acul montat la balonul cu mediul ce conține 400 ml bulion glucozat cu ascită sau ser și adaos de penicilinază și acid paraaminobenzoic. Incubarea se face la 37° în atmosferă cu adaos de CO_2 în proporție de 10%.

— Zilnic se controlează balonul de hemocultură prin :

a) Subculturi pe geloză-sînge înclinată care se incubează la 37° în atmosferă la 10 % CO$_2$.

b) Examen microscopic direct între lamă şi lamelă.

c) Frotiu colorat cu Gram.

Hemocultura se consideră negativă numai dacă subculturile din a 10-a zi au rămas sterile.

— În cazul apariţiei în subculturi a coloniilor izolate ele se controlează macroscopic cu lupa şi microscopic pe frotiu colorat cu Gram.

Se poate elibera un buletin provizoriu în care se indică izolarea din hemocultură a unui microb cu proprietăţile genului *Neisseria*.

— Din coloniile izolate tipice se efectuează subculturi pentru a obţine tulpina izolată în cultură pură.

— Subculturile se controlează pentru puritate prin frotiuri colorate Gram şi se efectuează următoarele teste necesare identificării :

- Determinarea spectrului de fermentaţie a glucozei, maltozei şi levulozei
- Efectuarea reacţiei peroxidazelor
- Identificarea serologică de tip prin reacţia de aglutinare
- Testarea sensibilităţii la antibiotice şi sulfamide
- Proba patogenităţii pe şoarece

Se eliberează buletinul definitiv, în care se descriu proprietăţile morfologice, de cultură, biochimice, antigenice, de patogenitate şi sensibilitatea la antibiotice şi sulfamide a tulpinii de meningococ izolate.

NEISSERIA GONORRHOEAE

Generalităţi

Descoperit în 1879 de către Neisser, gonococul este un coc ovalar, în formă de bob de cafea sau reniform, aşezat în diplo sau perechi de diplo, cu feţele scobite aşezate faţă în faţă, lipsit de capsulă, asporulat şi gram-negativ.

Gonococul, ca şi meningococul, este o bacterie strict parazită pentru om, se localizeează pe mucoasa căilor uro-genitale ale bolnavilor cu formă acută sau cronică de infecţie gonococică.

Rezistenţa gonococului la căldură, variaţii de temperatură, uscăciune şi dezinfectante este foarte scăzută. În mediul extern moare în cîteva ore. Din aceste motive, examenele pentru însămînţarea produselor patologice trebuie făcute cît mai repede de la recoltare şi obligatoriu pe mediile încălzite la 37°.

Gonococul este agentul patogen al infecţiei gonococice sau blenoragiei, sub toate formele. Determină, obişnuit, următoarele localizări :

— uretrită acută şi cronică la bărbaţi cu complicaţii : epididimite, orhiepididimite, prostatite etc. ;

— uretrită acută şi cronică la femeie, cu complicaţii ca : metrita colului uterin, salpingite, ovarite, bartholinite etc. Mai puţin frecvent pot apărea :

— vulvovaginita în colectivităţile de copii ;

— conjunctivita blenoragică la nou-născuţi ;

— complicaţii ale seroaselor ; artrite, meningite etc.

Diagnosticul de laborator

Recoltarea puroiului sau secreţiei uretrale pentru diagnosticul de laborator se face cu ansa de platină sau cu tampon de vată steril. Este important să se recolteze secreţia uretrală dimineaţa, înainte de urinare. La femeie, în stările de infecţie cronică, se recoltează secreţia preferabil după perioada menstruală, deoarece mucoasa congestionată a colului uterin elimină mai uşor gonococii cantonaţi în glandele mucoasei.

Recoltarea secreţiei vaginale nu se practică din cauza asociaţiei florei microbiene şi a pH vaginal, care împiedică dezvoltarea gonococului.

La fetiţe cu vulvite gonococice, prelevarea secreţiei se face cu ansa sau cu tamponul steril, de pe mucoasa vulvară.

Diagnosticul de laborator constă din cercetarea agentului patogen prin :

a) frotiul direct din secreţie sau puroi ;

b) însămînţarea şi izolarea gonococului din produsele patologice ;

c) reacţiile biochimice ;

d) reacţia de fixare a complementului.

Examenul microscopic direct prin frotiu al secreţiei gonococice este cea mai utilizată metodă şi de cele mai multe ori suficientă pentru stabilirea diagnosticului bacteriologic în infecţiile gonococice acute. Pe frotiurile colorate cu albastru de metilen şi cu metoda Gram se observă, în infecţia acută, foarte numeroase polimorfonucleare, filamente de mucus, celule descuamate din epiteliul mucoasei uretrale, iar flora microbiană este formată aproape exclusiv din diplococi reniformi gram-negativi, așezați intracelular și extracelular. Caracteristic infecției acute, unele leucocite polimorfonucleare sînt încărcate cu microbi fagocitați. Prezența diplococului extracelular și lipsa de fagocitoză nu exclud însă diagnosticul de gonococ. În infecția cronică, atît la bărbat, cît și la femeie, diagnosticul prin frotiu direct este mai greu, datorită apariției florei de asociație și a diplococilor saprofiți, cu morfologie identică cu a gonococului. În condițiile infecției acute, însă, prezența leucocitelor, cu numeroși diplococi fagocitați, constituie o imagine microscopică patognomonică. Însămînțarea produselor pentru izolarea microbului este destul de laborioasă, deoarece gonococul este sensibil la condițiile de mediu și se dezvoltă greu. Pentru a obține rezultate satisfăcătoare, însămînțarea trebuie făcută în condițiile următoare:

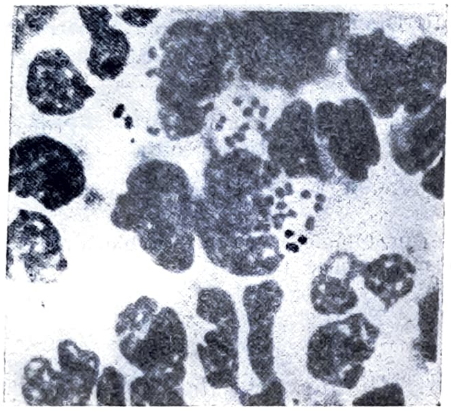


Fig. 304. — Neisseria gonorrhoeae, frotiu din secreția uretrală. Un leucocit plin cu gonococi (colorație Gram).

— pe medii speciale, bogate în substanțe albuminoase, cum este mediul cu hemoglobină și plasmă realizat de Peizer-Steffen;

— la temperatura optimă de 37°, mediile trebuie încălzite la termostat înainte de însămînțare;

— în perioada cînd prezența diplococului este maximă în produsele patologice, dimineața înainte de urinare și după congestia determinată de perioada menstruală;

— mediile însămînțate să fie incubate în atmosferă de 10—30% CO_2.

În lipsa mediului Peizer-Steffen se poate folosi și geloză-sînge, geloză-ser, geloză-ascită, geloză-șocolat. Pe aceste medii gonococul crește însă inconstant.

Gonococul se dezvoltă în colonii mici translucide, cu marginile ușor ridicate, sinuoase. Cînd coloniile suspecte de gonococ nu se pot identifica ușor, se recomandă încercarea reacției oxidazelor ca la meningococ. Reacția oxidazelor pozitivă arată că este vorba de colonii de *Neisseria.*

Fermentarea zaharurilor are o valoare secundară și completează studiul tulpinii izolate. Gonococul fermentează numai glucoza. În general, însă, diagnosticul bacteriologic, în cazuri de infecție gonococică acută, se poate rezuma la examenul frotiului direct din secreția uretrală. În cazurile de uretrită gonococică cu tendință la cronicizare, este utilă, uneori, tehnica de izolare a gonococului prin spermocultură. De asemenea, în cazurile de infecții cronice și complicații articulare se folosește reacția de fixare a complementului. În această reacție datorită structurii antigenice complexe și a variabilității tulpinilor de gonococ, dificultatea mare este obținerea unui antigen de calitate. Din aceste motive, se prepară de specialiști cu experiență extracte antigenice, prin precipitare cu acid tricloracetic, folosind cel puțin 10 tulpini de gonococ, izolate din infecții cît mai recente. Reacțiile pozitive de fixare a complementului cu antigen gonococic trebuie interpretate cu prudență, mai ales cînd sînt în discordanță cu simptomatologia clinică.

Gonococul este sensibil la sulfamide și numeroase antibiotice. În ultimul timp s-au selecționat numeroase tulpini de gonococ rezistente la sulfamide și penicilină. Rămîn active și au o mare eficacitate în formele acute, streptomicina, aureomicina, teramicina, cloramfenicolul și eritromicina. În formele cronice, tratamentul cu antibiotice este mai puțin eficace și se asociază vaccinoterapia antigonococică cu stoc-vaccin. Vaccinoterapia dă rezultate bune mai ales în complicații, orhite, epididimite și în artritele gonococice.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIEI GONOCOCICE

Schema de diagnostic

Produse patologice; secreție uretrală, secreție a mucoasei colului uterin, secreție conjunctivală, secreție vulvară, lichid spermatic

— Efectuarea a 2 frotiuri din produsul patologic ,unul se colorează cu Gram, iar celălalt cu albastru de metilen.

— Examen direct la microscop cu obiectivul de imersie : prezența cocilor reniformi sau în formă de boabă de cafea așezați în diplo, gram-negativ, fagocitați de leucocitele polimorfonucleare. este o indicație suficientă de infecție gonococică. Se urmărește pe frotiu găsirea cîtorva leucocite încărcate cu diplococi fagocitați în citoplasmă, care ne confirmă aspectele caracteristice în frotiu ale unei infecții gonococice acute.

Se eliberează un buletin de analiză, în care se arată că prin examen microscopic direct al secreției uretrale s-au decelat numeroși diplococi reniformi gram-negativi, intra- și extacelulari, precum și leucocite încărcate cu diplococi fagocitați, aspect caracteristic unei infecții gonococice acute.

— Prezența diplococilor reniformi gram-negativ, fără fagocitoză, exclusiv extracelulari nu ne îngăduie să stabilim prezența gonococilor, dar nici nu-i putem exclude.

— În aceste situații și în altele în care nu găsim diplococi gram-negativ, ci floră de asociație, poate să fie cazul unei infecții gonococice subacute sau cronice.

— Examenul microscopic direct nu mai este suficient și trebuie efectuate însămînțări pe medii speciale ca geloză-sînge, șocolat sau preferabil pe mediul Peizer-Steffen pentru izolarea gonococului. Mediile de cultură vor fi încălzite la 37° înainte de însămînțare și incubate la 37° în atmosferă cu adaos de 10% CO_2.

— Culturile se controlează macroscopic cu lupa pentru apariția coloniilor mici, convexe, translucide. Coloniile izolate se controlează prin frotiu colorat cu Gram și se fac subculturi pe alte plăci cu mediul Peizer-Steffen pentru izolarea tulpinii în cultură pură. Incubarea se face la 37° în atmosferă cu adaos de 10% CO_2.

— Cultura pură se controlează prin frotiu colorat cu Gram și se efectuează următoarele teste de identificare :

↓ Determinarea spectrului de fermentare a zaharurilor pe mediul Hiss pentru glucoză, maltoză, levuloză.

↓ Efectuarea reacției peroxidazelor.

↓ Testarea sensibilității la antibiotice pe geloză-sînge șocolat.

Se eliberează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, biochimice și sensibilitatea la antibiotice a tulpinii de gonococ, izolate.

— În unele cazuri de infecție cronică în lipsa altor metode de diagnostic care să confirme o infecție bănuită clinic de a fi gonococică se poate folosi R.F.C. cu antigen gonococic. Reacțiile pozitive trebuie interpretate cu prudență și numai în sensul confirmării diagnosticului clinic.

BIBLIOGRAFIE

ALERGANT C. D. — Streptomycin Resistant Gonorhoeae, *Brit. J. vener. Dis.*, 1958, vol. 34, p. 36—37.

BÎLBÎIE V. — Bacteriologia medicală, sub redacția prof. N. Nestorescu, Ed. medicală, București, 1961, p. 391—398.

BOER L. — Bacteriologia medicală, sub redacția prof. N. Nestorescu, Ed. medicală, București, 1961, p. 382—390.

CAPUSTO M. L., OVCINIKOV H. M. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecțioase (Sinai și Birgher), Ed. științifică, București, 1952, p. 213—219.

FIUMARA N. J., TODD B. P., YOUNG HAZEL D., WILSON JANET G. — An outbreak of gonorrhoeae in Massachusetts, *Amer. J. Publ. Hlth.*, 1959, vol. 49, p. 924—936.

GOLDSTEIN L. Z. — Gonococcal Infection in teen aged girls and mature women, *Brit. J. vener. Dis.*, 1957, vol. 33, p. 34—39.

GASTINEL P. — Précis de Bactériologie Médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 373—393.

GRIFFIN P. J., RIEDER S. V. — A study on the growth requirements of Neisseria gonorrhoeae and its clinical application, *Yale Journ. Biol. Med.*, 1957, vol. 29, p. 613—621.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 91—111.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approwed Laboratory, Techniques, ed. a 4-a, Ed. Appleton-Century, New York, 1945, p. 435—440.

MACKIE J. T., MCCARTNEY E. J. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 329—362.

RANADE S. N., RAJE C. K., KALYANPORKAR S. G. — Treatment of chronic gonococcal urethrites in the male worth chloramphenicol, *J. Indian med. Ds.*, 1956, vol. 27, p. 242—243.

SCHOENBACH O. E., HAHONEY F. J., THAYER J. D. — Bacterial and mycotic infections of man. R. Dubos, ed. a 2-a, Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 547—572.

SCHWENKE W., MILOSHLAG G. — Considerations on advantages and drowbacks of penicillin and chloramphenicol in the treatment of gonorrhoeae, *Z. ärztl. Fortbild*, 1956, vol. 50, p. 894—897.

STUART R. D., GROOKES EILEEN M. L. — Laboratory Policy in the diagnosis of female gonorrhoeae. Culture of smear, *Publ. Hlth Lab.*, 1959, vol. 17, p. 41—45.

THURMANN J. R. — Evaluation of treatment of acute gonorrhoeae in the male with varying dosage schedules, of penicillin V potassium, *Antibiot. Med.*, 1959, vol. 6, p. 295—296.

TOPCIU AURICA — Diagnosticul bacteriologic al infecțiilor meningococice, *Microbiologia (București)*, 1962, vol. 6, p. 497—508.

TOPCIU AURICA, DAN B., VOINESCU V. — Ancheta epidemiologică complexă în focarele de infecție meningococică. Rolul examenului bacteriologic în stabilirea sursei de infecții și a purtătorilor de meningococ, *Microbiologia (București)*, 1960, nr. 4, p. 341—346.

TOPLEY and WILSON'S — Principles of bacteriology and immunity, vol. I, ed. a 4-a, Ed. Edward Arnold, Londra, 1955, p. 620—645.

WHITBY L., HYNES M. — MedicalBacteriology, ed. a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 137—142.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, p. 288—299.

ZINSSER H — Textbook of bacteriology, ed. a 11-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New-York, 1957, p. 306—317.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU CORYNEBACTERIACEAE

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIFTERIEI

Familia: *Corynebacteriaceae*. Genul: *Corynebacterium*. Specia tip: *Corynebacterium diphteriae*

Generalități

Familia *Corynebacteriaceae* cuprinde bacterii parazite și patogene pentru plante și animale, iar unele fac parte din flora saprofită a solului.

Bacteriile parazite și patogene pentru plante și animale sînt grupate din punctul de vedere al sistematicii bacteriene într-un singur gen, genul *Corynebacterium*, care cuprinde 33 de specii.

Speciile genului *Corynebacterium* cuprind microorganisme care se aseamănă prin următoarele caractere generale: bacili scurți sau lungi, pleomorfi, uneori cu capetele umflate în formă de măciucă (*Coryne*), așezați ca niște bastonașe în palisade sau în grămezi caracteristice (L, X, *Y*) gram-pozitiv, cu o structură internă eterogenă, prezentînd granulații metacromatice, imobili, nesporulați, lipsiți de capsulă și neacidorezistenți. Sînt microbi care se dezvoltă obișnuit în condiții de aerobioză și microaerofilie, dar unele specii pot fi strict anaerobe. Metabolizează o serie de zaharuri cu formare de acid, dar niciodată gaz și reduc nitrații în nitriți. Cîteva specii sînt capabile să elaboreze, în anumite condiții, o exotoxină foarte activă. Unele tulpini sînt cromogene, dezvoltîndu-se pe mediile de cultură sub forma de colonii pigmentate galbene-cenușii sau galbene-portocalii.

Din punctul de vedere al patologiei infecțioase, există o singură specie patogenă pentru om: *C. diphteriae* și cîteva specii patogene pentru animale: *C. ovis*, *C. pyogenes*, *C. renale*, *C. equi*, *C. murisepticum* etc.

Din punctul de vedere al patologiei umane ne interesează diferențierea singurei specii patogene pentru om, *C. diphteriae*, de alte specii saprofite sau comensale pe care le etichetăm cu difterimorfi.

Corynebacterium diphteriae, bacilul difteric, este agentul patogen al difteriei.

Difteria este o toxiinfecție acută, caracterizată prin fenomene de intoxicație generală a organismului, determinată de exotoxina bacilului difteric. În această boală agentul patogen rămîne localizat la poarta de intrare, dînd naștere la o leziune locală caracteristică, denumită falsa membrană. Falsa membrană provine din reacția inflamatoare a mucoasei, determinată de acțiunea toxinei, care produce un bogat exsudat fibrinoleucocitar. Se prezintă ca un depozit cenușiu, care poate fi detașat cu greutate, lăsînd în urmă o suprafață sîngerîndă. Bacilii difterici se găsesc în număr mare la nivelul falsei membrane. Aci ei elaborează toxina, care pătrunde în circulația generală și se fixează pe centrii nervoși și în diferite viscere.

După poarta de intrare a germenilor în organism, se disting diferite forme clinice de difterie. Cea mai frecventă este forma amigdaliană sau angina difterică, care se poate complica cu crupul difteric sau difteria laringiană și cu rinita difterică, sau difteria nazală. Mai există, de asemenea, conjunctivitele difterice și mai rar, difteria chirurgicală a plăgilor și vulvita difterică a fetițelor. Indiferent care ar fi forma clinică de boală, bacilul difteric rămîne localizat la poarta de intrare, de unde elaborează toxina, responsabilă de toată simptomatologia atît de variată a difteriei. Capacitatea de fixare a toxinei difterice în țesuturi fiind foarte rapidă, decurge de aci necesitatea diagnosticului rapid al difteriei. Scopul imediat al diagnosticului este instituirea de urgență a seroterapiei specifice, cu ser antitoxic, în vederea neutralizării cît mai rapide a toxinei circulante.

C. diphtheriae este un bacil drept sau ușor încurbat, de 2—4 μ lungime și 0,5 μ lățime. În culturi vechi ei pot fi uneori mai lungi sau mai scurți. Extremitățile bacilului sînt uneori ușor umflate și iau forma de măciucă sau de halteră, de unde și numele de *coryne* (măciucă). Caracteristicile morfologice ale bacilului difteric sînt :

– pleomorfism foarte accentuat ; în aceeași cultură se pot întîlni forme foarte variate ;

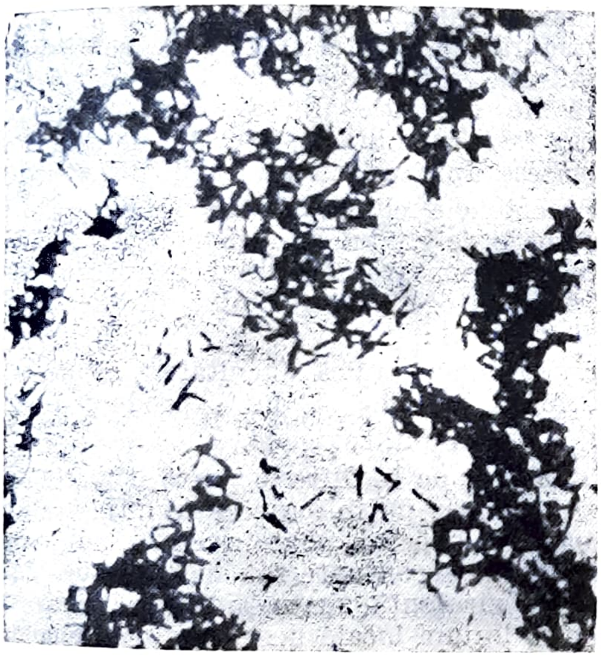


Fig. 305. — C. diphtheriae. Forme tipice cu dispoziția caracteristică în V, L, X, Y. — Cultură de 24 de ore pe ser Löffler (colorație Gram) (colecția autorului).

– dispoziția caracteristică ; pe frotiu apar așezați în formă de litere chinezești, mînă cu degetele răsfirate sau în dispoziția de *V*, *L*, *X* și *Y* ;

– colorabilitatea ; bacilul difteric este gram-pozitiv la limită ; de aceea este necesar ca decolorarea cu alcool-acetonă să fie urmată rapid de spălare cu apă. Microbii apar uneori colorați granular. Prin metoda de colorație specială, albastru de metilen alcalin Löffler, colorația Del Vecchio sau colorația de contrast Neisser, se pun în evidență corpusculii metacromatici Babeș-Ernst. Ei apar sub forma unor granulații situate la capetele sau interiorul corpului bacilar. Colorabilitatea selectivă a acestor corpusculi, bazată pe fenomenul de metacromazie, se datorește faptului că ei au o structură chimică deosebită și reprezintă, probabil, o substanță de rezervă a bacteriei — volutina — care are o mare afinitate față de coloranții de anilină.

Habitat

Se întîlnește în rinofaringele bolnavilor de difterie și la purtătorii convalescenți și cronici de bacili difterici. Omul este singura gazdă naturală a *C. diphtheriae.* Se transmite la om pe cale respiratorie, prin tuse, strănut, vorbire, în urma contactului direct cu bolnavii sau purtătorii. Există rar și cazuri cînd transmiterea se poate face indirect, prin obiectele contaminate, mai ales prin jucăriile copiilor bolnavi de difterite.

Rezistența

Rezistă bine la uscare, 1—2 luni, pe obiecte contaminate. Temperatura de 55—60° îi omoară în 15 minute. Antisepticele în concentrațiile obișnuite îi omoară rapid ; de pildă, sublimatul $1^{0}/_{00}$ îi omoară în 5 minute. Penicilina este bactericidă pentru bacilul difteric, dar fără efect asupra exotoxinei.

Infecția la om

Bacilul difteric este întîlnit în natură numai în leziunile bolii specifice la om și în rinofaringele purtătorilor umani sănătoși. De la una din aceste 2 surse, bacilul difteric ajunge direct prin tuse, vorbit sau strănut în căile respiratorii superioare ale unui individ susceptibil sau indirect prin obiectele și rufăria bolnavului.

Creșterea inițială a bacililor are loc în stratul superficial de mucus și pe celulele epiteliale descuamate ale mucoasei faringiene. O dată cu creșterea și înmulțirea bacililor se elaborează o cantitate mică de toxină difterică. Această toxină, foarte difuzibilă, este adsorbită de celulele din vecinătate și pătrunde în țesutul mucoasei pe care îl distruge în cîteva ore prin acțiunea ei necrozantă. Acest cuib de țesut necrotic creează condiții deosebit de favorabile pentru creșterea ulterioară a bacililor, care elaborează astfel cantități mari de exotoxină și procesul necrozant se întinde lateral și se adîncește în țesuturi.

Din partea organismului apare o reacție de apărare de tip inflamator, capilarele mucoasei sînt turgescente (congestie = angină), leucocitele, hematiile și serul se extravazează. Se realizează, astfel, în țesut, un exsudat care conține leucocite, hematii, bacili și fibrină. Acest exsudat, pe măsură ce procesul infecțios se dezvoltă devine mai gros, mai organizat, de culoare cenușie, cu aspect de pseudomembrană, care acoperă leziunea. Leziunea inițială poate cuprinde mucoasa amigdalină sau întreaga mucoasă a faringelui posterior. În acest stadiu bolnavul are o febră moderată în jurul a 38° și o jenă în gît. În contrast cu febra moderat crescută și semnele locale discrete, bolnavul prezintă o alterare a stării generale, care se accentuează pe măsura intoxicației treptate a organismului cu toxina difterică. Falsa membrană poate să se extindă cu ușurință pînă la laringe determinînd difteria laringeană sau crupul difteric sau spre fosele nazale, dînd rinita difterică.

În clinică, după gravitatea bolii, se deosebesc trei forme ale toxiinfecției difterice:

— forma obișnuită, cu toată simptomatologia caracteristică difteriei;

— forma ușoară, frustă;

— forma malignă, hipertoxică, care duce uneori repede la exitus.

Unii autori atribuie tipului *gravis* formele maligne, hipertoxice, de difterie, iar tipului *mitis* formele ușoare. Există numeroase statistici care tind să dovedească acest lucru. Dar nu este mai puțin adevărat că există o serie de date — tot statistice — prin care se arată lipsa unei relații reale între tipul de germen infectant și forma clinică. Se spune că, tipul *gravis* ar forma mai multă toxină și ar elabora-o mai rapid decît tipul *mitis*. În laborator însă se constată că tipul *gravis*, de regulă, nu produce mai multă toxină decît multe tulpini de *intermedius* sau *mitis*. Tulpina utilizată astăzi pentru producerea toxinei în laborator — așa-numita tulpină *Park-Williams Nr. 8* — este de tipul *mitis*. Cercetări recente au arătat că tipul *gravis* secretă — pe lîngă toxină — și hialuronidază; aceasta ar contribui poate la o difuziune mai rapidă a toxinei. În toate aceste cercetări nu se ține seama în suficientă măsură de faptul că forma clinică a unei boli infecțioase este, de fapt, rezultatul a doi factori: microbul infectant și reactivitatea organismului. Privind astfel lucrurile, importanța care se acordă tipurilor de bacil difteric pierde mult din valoarea ce i se atribuia, în trecut.

Difteria umană este caracterizată prin localizarea bacilului difteric la poarta de intrare, unde provoacă leziuni locale, și prin fenomene de intoxicație generală, datorite difuziunii toxinei în organism și fixării ei pe celulele țesuturilor sensibile. Forma cea mai frecventă este angina difterică, apoi laringita și rinita difterică, ambele fiind, cel mai des, secundare unei angine. Se întîlnește de asemenea, uneori, difteria plăgilor chirurgicale și extrem de rar, difteria mucoasei vulvare la copii. Oricare ar fi localizarea, simptomele de intoxicație generală sînt aceleași. Leziunea locală caracteristică este falsa membrană, de întindere și grosime variabilă, de culoare albă-cenușie sau galbenă-cenușie murdară, aderentă de țesuturile lezate. La suprafața acestei membrane se găsește o adevărată cultură de bacili difterici, uneori cu floră de asociație din rinofaringe. În zona dintre falsa membrană și țesutul de care aderă, se găsesc aproape numai bacili difterici.

Fenomenele clinice locale și generale sînt în funcție de gradul de rezistență a bolnavului și de patogenitatea bacilului difteric în cauză. Puterea patogenă a bacilului difteric depinde de doi factori:

1. Virulența, adică facultatea sa de a se multiplica *in situ* și de a produce leziuni;

2. puterea lui toxigenă.

O tulpină de b. difteric poate fi foarte virulentă și relativ puțin toxică sau puțin virulentă și foarte toxică sau poate avea ambele proprietăți foarte accentuate sau foarte slabe. Tulpinile cu virulență mare și puțin toxice vor provoca leziuni locale accentuate, cu fenomene de intoxicație generală relativ redusă, iar cele cu putere toxigenă mare vor provoca fenomene de intoxicație generală gravă. Formele hipertoxice sînt însoțite de un sindrom hemoragic. Mai tîrziu pot apărea pareze, paralizii locale și periferice și polinevrite. Moartea este, în general, provocată de tulburări ale funcțiilor cardiace, în special fenomene de miocardită. În cazurile benigne de difterie, simptomele se limitează la o angină eritematoasă sau pultacee; vindecarea spontană este, în acest caz, urmată adesea de paralizii tardive care interesează, atît nervii cranieni, în special oculomotorul, perechea a IX-a, a X-a, cît și ceilalți nervi.

Infecția experimentală

Difteria fiind o toxiinfecție, patogenitatea bacilului difteric se sprijină aproape exclusiv pe elaborarea de toxină.

Efectul inoculărilor cu toxină difterică, la animalele de laborator, este bine studiat și cunoscut (Roux și Yersin); mai puțin bine cunoscut este modul de acțiune a toxinei difterice.

Dintre animalele de laborator, cobaiul este cel mai sensibil la intoxicația difterică. Inocularea subcutanată a unei doze limite mortale (D.L.M.) provoacă la locul de inoculare un edem puternic în primele 24 de ore, însoțit de un exsudat fibrinoleucocitar și moartea în 4 zile. La autopsie, cea mai constantă și caracteristică leziune este congestia și hemoragia în capsulele suprarenale. Această leziune este considerată ca patognomică pentru intoxicația difterică experimentală; foarte adesea, se constată prezența unui exsudat serosanguin în peritoneu, în pleură și pericard. În exsudat se poate pune în evidență prezența toxinei difterice. Examenul histopatologic arată leziuni de miocardită și degenerare grasă a miocardului. Dacă se inoculează mai multe doze mortale deodată, moartea animalului survine mai curînd, 24—48 de ore, iar în acest caz, esxudatele din cavitățile seroase lipsesc. Dacă doza de toxină inoculată este sub doza mortală, animalul moare mult mai tîrziu. În acest caz, la locul edemului, care dispare după cîteva zile, apare o escară care se elimină și se formează o cicatrice. Animalul slăbește mult și poate prezenta tardiv paralizii periferice; în acest stadiu, în urma unui efort poate muri subit. La autopsie se constată leziuni importante ale miocardului.

Iepurele, pisica, porumbelul, găina sînt mai puțin sensibile; șoarecele și șobolanul alb sînt mai rezistenți. Frobisher a reușit să obțină paralizii difterice la șoarece prin inoculare intracerebrală.

Toxina se fixează extrem de repede pe țesuturi; inocularea pe cale intravenoasă a unei cantități de antitoxină capabilă să neutralizeze de 10 000 ori doza de toxină inoculată intradermic nu neutralizează efectul toxinei, chiar dacă inocularea de antitoxină a fost făcută numai 15 minute după cea de toxină.

Din datele experimentale și clinice, rezultă că toxina difterică se fixează foarte repede pe anumite celule ale organismului. Această fixare este un fenomen ireversibil, chiar dacă se administrează ulterior mari cantități de antitoxină.

După Pappenheimer, modul de acțiune a toxinei difterice în organism ar fi prin gruparea proteinică a citocromului B al b. difteric, care blochează citocromul celulei intoxicate și împiedică astfel respirația celulei. Pe baza diferențelor de permeabilitate ale celulelor s-ar explica afinitatea selectivă a toxinei pentru anumite țesuturi, ca, de pildă, miocardul la om și suprarenalele la cobai.

Diagnosticul de laborator

Recoltarea produsului patologic se face de la bolnavi (exsudat din falsa membrană) și de la purtători (exsudat faringian și nazal). Recoltarea, într-un caz ca și în celălalt, se face cu ajutorul unui tampon steril. Bolnavul nu-și va clăti cavitatea bucală cu vreun antiseptic cu cel puțin 3—4 ore înainte de recoltare; la fel și purtătorii.

Transportul tamponului la laborator se va face în timpul cel mai scurt posibil, pentru a nu se usca. Introducerea unui mediu lichid de îmbogățire în schema de diagnostic scade procentul rezultatelor negative, care proveneau din uscarea tamponului în timpul unei perioade lungi de transport.

Diagnosticul se bazează pe însămînțarea produsului patologic și examenul citobacterian al frotiurilor direct din falsa membrană. Dacă se recoltează două tampoane, cu unul din ele se efectuează întîi însămînțarea pe 2—3 tuburi cu mediul Löffler și apoi se face un frotiu direct. Cel de-al doilea tampon se introduce în mediul de îmbogățire O.C.S.T. Dacă nu s-a recoltat decît un tampon, se efectuează întîi însămînțarea pe 2—3 tuburi cu mediu Löffler și apoi în mediul O.C.S.T. Se renunță la frotiul direct, care se poate efectua și ulterior, valoarea lui fiind relativă pentru diagnosticul difteriei, dar utilă pentru diagnosticul diferențial cu angina fuzospirilară Vincent.

Mediile de cultură se așază la termostat. Examinarea culturilor pe mediu Löffler va începe din a 8-a oră după însămînțare, cînd bacilii difterici încep să se dezvolte, spre deosebire de difterimorfi și de ceilalți microbi din flora de asociație a rinofaringelui, care se dezvoltă abia după 20 de ore. Frotiul direct din exsudatul faringian va fi colorat cu colorația Gram. Pe frotiul direct vor apărea celule polimorfonucleare, celule endoteliale și o floră de asociație, în care vor apărea și bacili difterici. Prezența bacililor în frotiu nu dă o indicație precisă de diagnostic și obligatoriu trebuie să ne adresăm examenului culturilor pe mediul Löffler.

Coloniile suspecte de bacili difterici se examinează prin frotiu. Frotiurile din culturi se colorează cu colorația Gram, cu colorația cu albastru Löffler + Lugol sau colorația Neisser pentru corpusculi metacromatici.

Tehnica colorației corpusculilor Babeș-Ernst cu albastru Löffer și Lugol (*Del Vecchio*). Frotiul se acoperă cu albastru de metilen alcalin Löffler, timp de 10 minute, apoi se spală cu apă şi se acoperă cu Lugol, timp de alte 10 minute, după care se spală cu apă, se usucă şi se examinează la microscop. Bacilii difterici apar verzui-închişi, iar corpusculii bruni. În caz că microbul pare a fi difteric, se semnalează, de urgenţă, medicului clinician posibilitatea unei difterii, iar acesta, bazat şi pe simptomatologia clinică, instituie de urgenţă seroterapia. Lipsa bacililor din frotiu nu exclude difteria, iar medicul clinician poate institui seroterapia numai pe baza semnelor clinice, diagnosticul clinic urmînd să fie confirmat prin metodele de laborator.

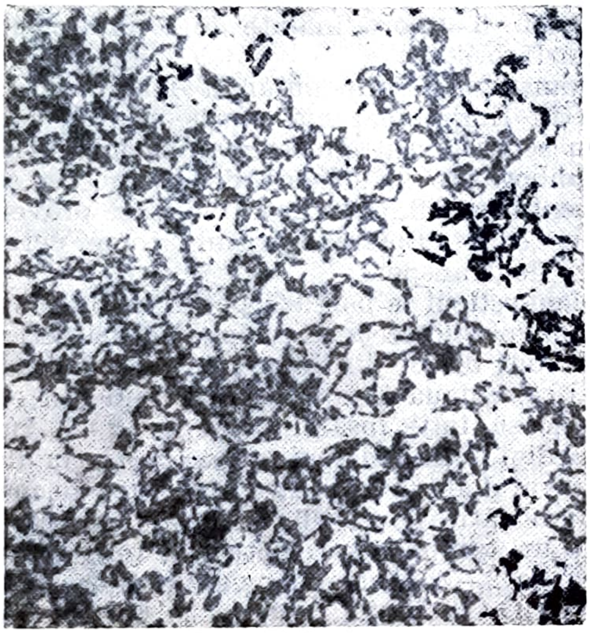


Fig. 306. — C. diphtheriae, corpusculii Babeş-Ernst, frotiu din cultură pe mediul Löffler (coloraţie Del Vecchio) (colecţia autorului).

Identificare şi diagnostic diferenţial

Colonia suspectă de bacil difteric de pe mediul Löffler se trece pe mediile selective Gundel-Tietz şi Clauberg, pentru a putea fi identificată din punctul de vedere al proprietăţilor de cultură, biochimice şi de patogenitate şi pentru a o diferenţia de difterimorfi, cu care poate fi uşor confundată. Din mediul de îmbogăţire O.C.S.T. facem, de asemenea, dispersii cu ansa pe medii selective, Clauberg şi Gundel-Tietz. Din coloniile suspecte izolate pe mediul Löffler, care serveşte de stocaj, se fac ulterior însămînţările necesare pentru studiul caracterelor biochimice şi de patogenitate pe animal.

Caractere de cultură

C. diphtheriae este aerob, se dezvoltă şi în condiţii de microaerofilie, spre deosebire de difterimorfi, care cresc numai aerob. Se dezvoltă la temperatură între 20 şi 40°, optimul 36–37°, pH optim = 7,8–8,2. Ca necesităţi de creştere el cere un număr mare de aminoacizi şi factori de creştere: acid pimelic, β-alanină şi acidul nicotinic, iar ca surse energetice, glucidele.

Mediul de elecţie. Mediul Löffler este un amestec din 3 părţi ser de bou şi o parte bulion glucozat 1%. Pe mediul Löffler bacilul difteric dă colonii albe-cenuşii opace, cu centrul uşor proeminent, care se detaşează uşor de pe suprafaţa mediului. Coloniile au aspect de picături de spermanţet.

Medii elective. Mediul Gundel-Tietz conţine sînge de oaie sau de iepure, cistină şi telurit de potasiu. Teluritul de potasiu inhibează dezvoltarea celorlalţi microbi şi este absorbit şi redus de bacilul difteric. Telurul metalic, care rezultă din reducerea teluritului, dă coloniilor de bacili difterici o culoare cenuşie sau neagră. După aspectul dezvoltării coloniilor de

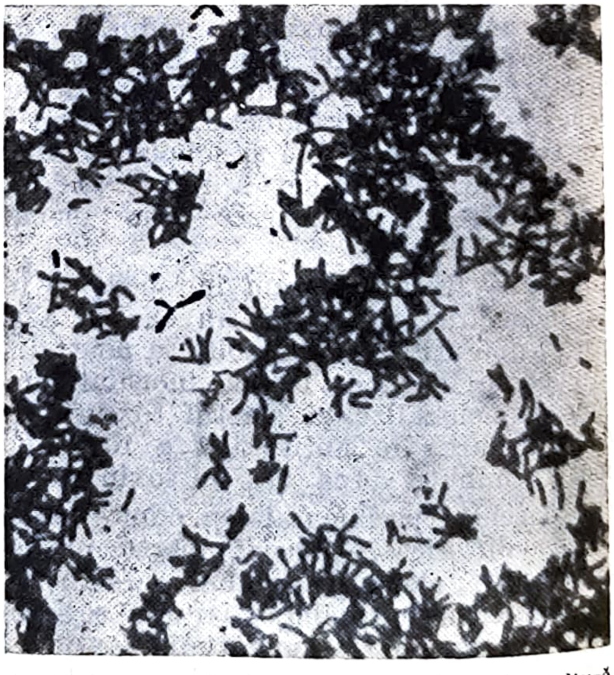


Fig. 307. — C. diphtheriae, forme măciucate, cultură de 24 de ore pe ser Löffler (coloraţie Gram) (colecţia autorului).

bacili difterici pe acest mediu s-a putut diferenția 3 tipuri de creștere :

— tipul *gravis*, care se prezintă sub forma de colonii negre uscate, cu suprafața rugoasă, cu centrul proeminent și marginile crenelate, dînd coloniei aspectul de margaretă ;

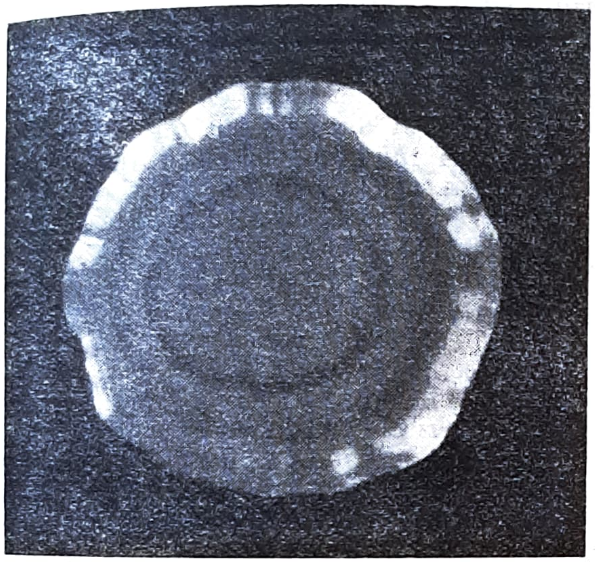


Fig. 308. — *C. diphtheriae*, colonie tip *gravis* pe mediul Gundel-Tietz.

— tipul *mitis* dă colonii cenușii bombate, netede, lucioase, cu marginile regulate, rotunde și translucide ;

— tipul *intermedius* prezintă colonii cu caractere de trecere între cele două tipuri.

Mediul Clauberg conține geloză-sînge, glucoză, telurit de potasiu, cistină, acetat de sodiu și un indicator : wasserblau, care virează albastru în mediu acid. Pe acest mediu, coloniile de bacili difterici apar negre, cu un halou albastru închis. Difterimorfii lasă mediul neschimbat în jurul coloniilor. Bacilul difteric fermentează glucoza și acidifică mediul în jurul coloniei ; aceasta se traduce prin virarea indicatorului spre albastru închis și determină apariția *halo*-ului albastru caracteristic.

Pe bulion. Tipul *gravis* dă sediment grunjos, nu tulbură mediul și formează membrană la suprafață. Tipul *mitis* tulbură bulionul și formează membrană. Tipul *intermedius* dă un sediment granular, nu tulbură mediul, dă foarte rar membrană.

Pe geloză bacilii difterici dau colonii lucioase, cu marginile tăiate drept și se dezvoltă mai încet ca pe mediul Löffler, abia în 24 de ore.

Caractere biochimice

— *C. diphtheriae* fermentează glucoza, maltoza, levuloza și glicerolul. Nu fermentează zaharoza și lactoza.

— *C. hoffmanni* nu fermentează nici un zahăr.

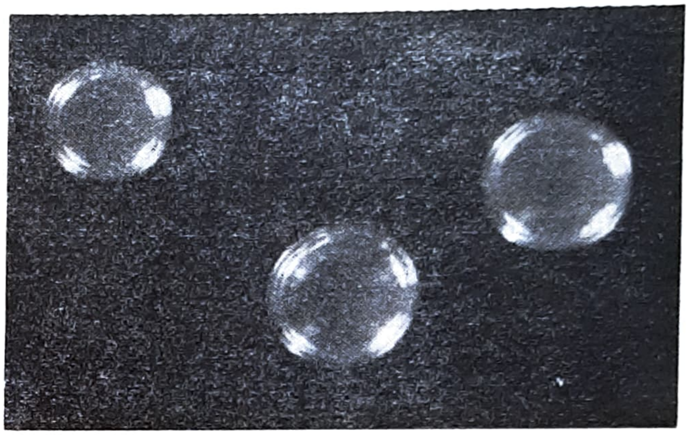


Fig. 309. — *C. diptheriae*, colonii de tip *mitis* pe mediul Gundel-Tietz.

— *C. xerose* fermentează glucoza, maltoza, zaharoza și levuloza.

Cu ajutorul fermentației zaharurilor se pot diferenția tipuri de bacili difterici în interiorul speciei, și anume : tipul *gravis* fermentează amidonul și dextrina, tipul *mitis* și *intermedius* nu fermentează nici unul din aceste zaharuri. Diferențierea tipurilor între ele se mai face și cu ajutorul metodei hemolizei :

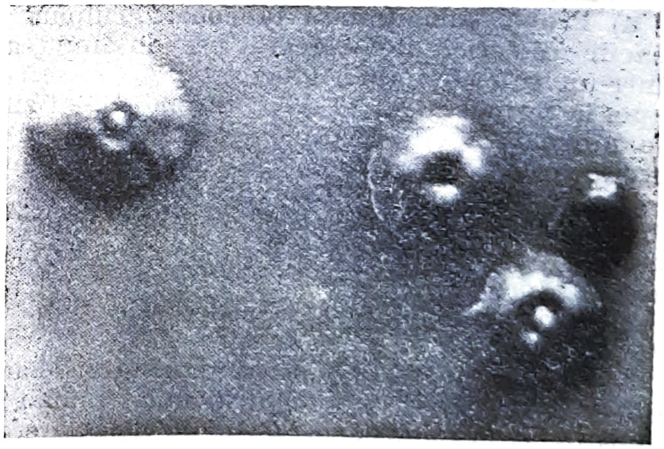


Fig. 310. — *C. diphtheriae*, colonii de tip *gravis*, pe mediul Löffler.

— tipul *gravis* hemolizează hematiile de iepure și nu hemolizează hematiile de bou ;

— tipul *mitis* hemolizează ambele feluri de hematii;

— tipul *intermedius* nu hemolizează.

Evidențierea acțiunii cistinazei după metoda Pisu completează testele de fermentare a zaharurilor. Metoda se bazează pe proprietatea bacilului difteric de a descompune cistina cu producere de H_2S și pe calitatea acestuia de a înnegri mediul de cultură în prezența acetatului de plumb. Însămînțarea culturii de bacil difteric de cercetat se face prin înțepare. După incubare, timp de 24 de ore la 37°, se constată că bacilul difteric crește în profunzimea mediului pe traiectul ansei și descompune cistina, cu eliberare de H_2S, care în prezența acetatului de plumb din mediu, produce o înnegrire accentuată pe linia de înțepătură. Testul poate servi și drept criteriu de diferențiere cu difterimorfi, care fiind exclusiv aerobi, nu cresc în profunzimea mediului de cultură și nu posedă în echipamentul lor enzimatic cistinaza.

Determinarea patogenității unei colonii suspecte prin inoculare la cobai

(*determinarea toxinogenezei* in vivo)

Pentru a dovedi că o colonie, prin caracterele de cultură, morfologice și biochimice este cu adevărat *C. diphtheriae*, trebuie să inoculăm cultura la animalul sensibil și să reproducem leziunile tipice de difterie experimentală.

a) **Proba subcutanată la cobai.** Tulpina de bacili difterici de cercetat se însămînțează într-un tub cu bulion glucozat $2^0/_{00}$ și se ține apoi la termostat la 35—37°, timp de 2—4 zile; se inoculează cîte 2 ml cultură la 2 cobai în greutate de 250—270 g, pe cale subcutanată, regiunea abdominală. Unul din cei doi cobai primește, pe cale subcutanată, cu 3 ore înainte de inocularea culturii, o cantitate de 1 000 U.A. ser antidifteric.

Cobaii sînt ținuți sub observație timp de 30 de zile.

— Dacă tulpina de cercetat conține bacili difterici toxigeni, la cobaiul inoculat numai cu cultură se produce, la locul de inoculare, un edem gelatinos, adeseori hemoragic, urmat după cîteva zile de necroza țesuturilor și escară (leziunile locale sînt considerate specifice de intoxicație difterică, dacă nu apar și la martor).

— Dacă toxina elaborată se găsește în cultura inoculată într-o cantitate mai mare (cîteva doze minime mortale) cobaiul moare, iar la necropsie se constată prezența de lichid în pleură și pericard, congestie generalizată în toate organele, hipertrofia și congestia capsulelor suprarenale (leziuni anatomopatologice macroscopice specifice de intoxicație difterică).

— Dacă tulpina este foarte slab toxigenă și în cultura inoculată se găsesc cantități mici de toxină (sub o doză minimă mortală), animalul face o intoxicație cronică, care se manifestă prin pierdere progresivă în greutate, cașexie, pareze, paralizii, care survin după 15—20 de zile de la inoculare și, în cele din urmă, moartea animalului. De remarcat că paraliziile tardive la cobai pot fi datorite nu numai intoxicației cu cantități mici de toxină difterică, dar ele pot apărea și în cursul altor stări patologice la cobai, și anume în meningo-encefalomielita proliferativă (Römer) sau avitaminozele A și E. Ele își păstrează valoarea diagnostică dacă nu apar și la martor.

— Dacă al doilea cobai, care a primit cu 3 ore înainte de cultură 1 000 U.A. antitoxină difterică, nu prezintă nici una din leziunile locale descrise mai sus și supraviețuiește, aceasta ne confirmă că leziunile observate la primul cobai erau specifice de intoxicație difterică, deoarece ele au fost suprimate la al doilea animal, la care toxina difterică din cultură a fost neutralizată specific de antitoxina inoculată cu 3 ore înainte.

b) **Proba intradermică pe iepure.** Se încarcă cîteva anse de cultură, de 24 de ore, pe mediul Löffler și se suspendă în 2—3 ml bulion. Din această suspensie se inoculează 0,1 ml, pe cale intradermică, pe jumătatea dreaptă a spinării unui iepure epilat [1], unde se pot testa deodată pînă la 10—16 tulpini de bacili difterici. După 4 ore se inoculează animalului, pe cale intravenoasă, în vena marginală a urechii, 2 000 U.A. ser antidifteric. După cîteva minute de la inocularea serului, se inoculează pe jumătatea stîngă a spatelui, în acel ași condiții, tulpinile care au fost inoculate pe jumătatea dreaptă. O dată cu inocularea tulpinilor de cercetat, se inoculează și o tulpină de colecție sigur toxigenă, ca martor.

Reacțiile se citesc zilnic, timp de 4 zile. Sînt considerate reacții pozitive acelea care

---

[1] *Technica de depilare:*

Amestec depilator	Sulfură de bariu	50 g
	Oxid de zinc	35 g
	Amidon	60 g

Se tunde părul cu foarfecele și se aplică o pastă făcută cu amestecul depilator, la care se adaugă puțină apă. Se lasă un minut, apoi se șterge cu un tampon îmbibat în apă caldă. Se unge apoi pielea depilată cu gicerină și se lasă animalul în repaus pînă a doua zi, cînd poate fi inoculat.

se manifestă prin eritem şi infiltrat, care persistă în a patra zi de inoculare, şi cu atît mai mult acele reacţii care merg pînă la necroză-escară. Aceste leziuni locale sînt specifice, în cazul cînd reacţiile sînt negative pe jumătatea stîngă a spatelui, unde au fost inoculate aceleaşi tulpini, însă după administrarea de antitoxină difterică.

Determinarea toxigenezei in vitro *a unei tulpini de b. difteric*

(metoda precipitării în gel după Elek-Ouchterlony-Frobisher)

Se foloseşte un mediu cu geloză cu proteoză-peptonă, care se topeşte în prealabil, se răceşte la 45° şi se toarnă în plăci Petri. După ce mediul a fost turnat în plăci, în timp ce agarul este încă moale, se ia cu pensa flambată o fişie de hîrtie de filtru de aproximativ 6 × 1,5 cm, sterilizată la căldură uscată. Se îmbibă în ser antidifteric nefenolat cu 500 U.A. pe ml, se lasă cîteva secunde să se scurgă excesul, şi se aşază fişia în centrul cutiei Petri, apăsînd-o în profunzimea stratului de agar. Mediul este lăsat apoi să se solidifice, iar cutia Petri este aşezată la 37°, timp de 1—3 ore, cu capacul parţial deschis, pentru a pierde umiditatea. Însămînţarea tulpinii de cercetat se face dintr-o cultură de 24 de ore în bulion sau mediul Löffler, descărcînd ansa pe o direcţie perpendiculară pe fişia de hîrtie de filtru. Se pot însămînţa pe o placă Petri 3—4 tulpini, una dintre ele fiind, în mod obligatoriu, o tulpină de colecţie sigur toxigenă (martor). Se incubează timp de 48 de ore la 37°, se face o primă citire a rezultatelor, se ţine apoi 24-48 de ore la frigorifer; reacţia se intensifică şi se face citirea definitivă.

Antitoxina difterică cu care este îmbibată fişia de hîrtie de filtru difuzează în stratul de mediu, unde o găsim în concentraţii din ce în ce mai mici, cu cît ne depărtăm de fişie, spre periferia plăcii Petri. Tulpina de bacili difterici sigur toxigenă (martor) se dezvoltă, formînd o linie de cultură perpendiculară pe banda de hîrtie de filtru. Această tulpină elaborează toxina difterică, care difuzează şi ea în grosimea mediului de cultură, unde o găsim în concentraţii din ce în ce mai mici, cu cît ne îndepărtăm de linia de însămînţare. Acolo unde antigenul (toxina difterică) se întîlneşte cu anticorpul (antitoxina difterică) apare o zonă de precipitare, sub forma unei linii de intensitate variabilă, situată pe unghiurile dintre linia orizontală de cultură şi fişia perpendiculară de hîrtie de filtru, ca o frumoasă demonstrare grafică vie, care reprezintă legea proporţiilor optime în reacţiile coloidale. Liniile care rezultă din precipitat reprezintă, toate, punctele de întîlnire a proporţiilor optime de amestec al celor două elemente, toxina şi antitoxina.

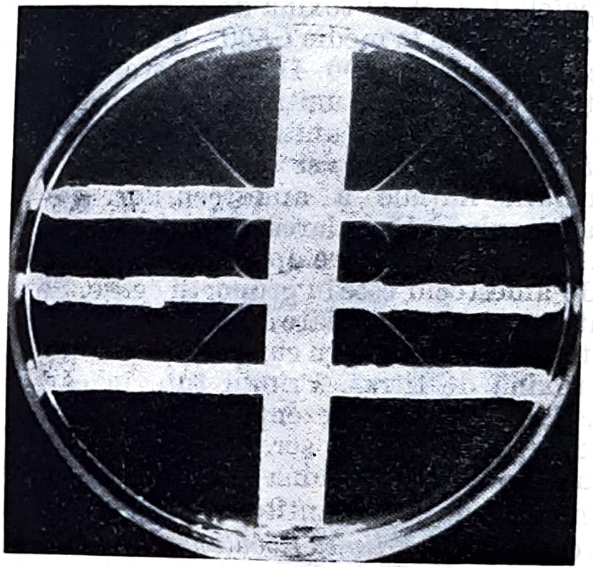


Fig. 311. — Reacţie de precipitare în gel E.O.F. pentru evidenţierea toxinogenezei *in vitro* la *C. diphtheriae* (Laboratorul secţiei „Difterie" al Institutului „Dr. I. Cantacuzino").

Dacă tulpina de bacili difterici de cercetat este o tulpină toxigenă, ea va elabora toxina difterică, iar în unghiul format de linia de însămînţare cu banda de hîrtie de filtru va apărea linia de precipitare descrisă mai sus. Dacă tulpina este netoxigenă, linia de precipitare nu apare.

Testul de precipitare în gel este o metodă simplă, puţin costisitoare, demonstrativă, capabilă să pună în evidenţă cantităţi mici de toxină difterică.

Imunitatea

Toxina difterică este puternic antigenică. Inoculată în cantităţi subletale, ea provoacă apariţia anticorpilor antitoxici, capabili să protejeze animalul faţă de o nouă inoculare cu doze letale de toxină. Prin tratarea toxinei difterice cu formol la temperatura de 40°, se obţine un produs lipsit de proprietăţi toxice şi posedînd calităţi antigenice. Acest produs, care serveşte la imunizarea activă împotriva difteriei, este *anatoxina difterică* sau *formol-toxoidul*.

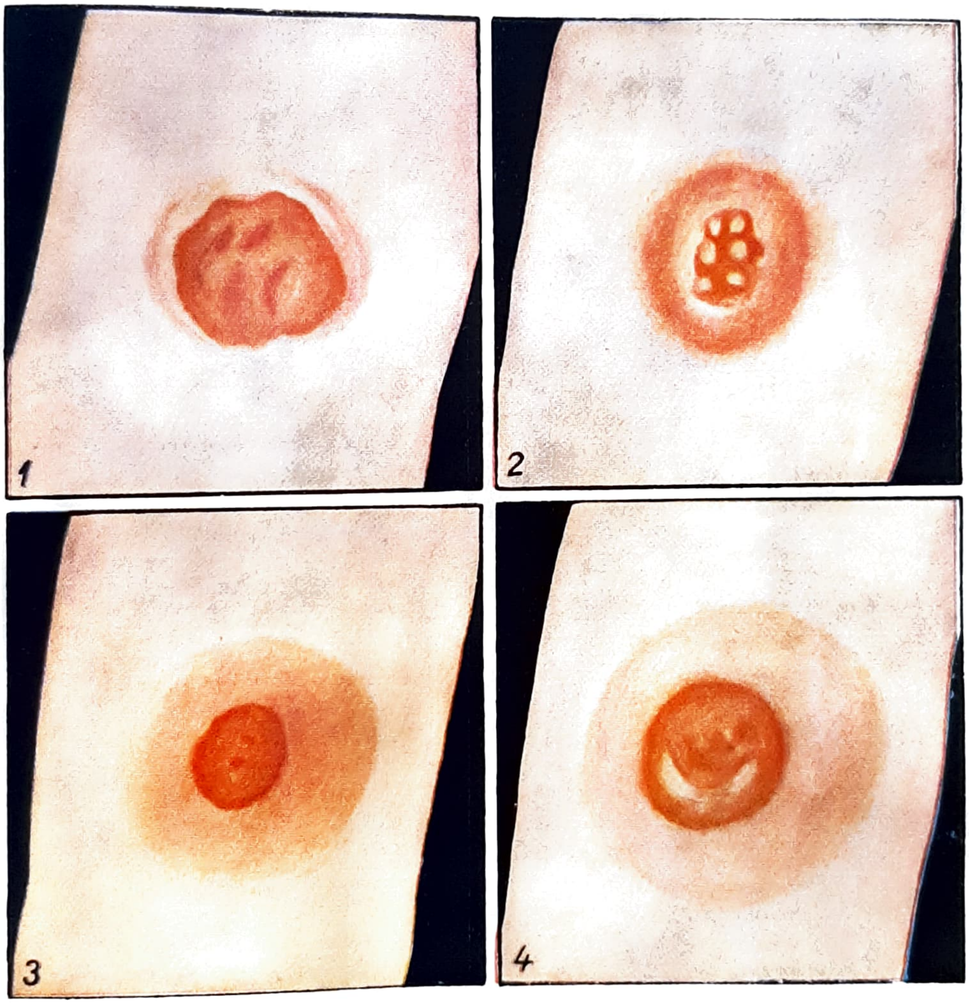


Fig. 312. — Intradermoreacţie Schick :
– reacţie pozitivă după 48 de ore; 2 – reacţie pozitivă după 5 zile;
3 – pseudoreacţie pozitivă; 4 — reacţie pozitivă combinată.

Titrarea toxinei se face *in vivo* pe cobai şi iepure, *in vitro* prin metoda floculării (Ramon).

Titrarea in vivo a toxinei se efectuează determinînd doza limită mortală pentru cobai, care reprezintă cantitatea minimă de toxină difterică capabilă să omoare un cobai de 250 g, în 4 zile. Doza limită mortală se înseamnă cu iniţialele D.L.M. O toxină de bună calitate trebuie să conţină în medie 1 500—2 000 D.L.M./ml. Efectul toxic a 100 D.L.M. este neutralizat — teoretic — de o unitate de antitoxină care reprezintă 1 U.A. (unitate antitoxică).

Titrarea in vitro se bazează pe principiul floculării iniţiale a amestecurilor de toxină şi antitoxină. Floculare este o reacţie de tip antigen-anticorp, care apare cel mai rapid acolo unde amestecul este în proporţii egale. Se pun în contact cantităţi variate dintr-un ser antidifteric (antitoxina) cu un titru cunoscut, cu cantităţi fixe de toxină de titrat. Primul tub, în care apare floculare, indică prezenţa unor cantităţi echivalente de toxină şi ser. Deci, cunoscînd titrul serului, putem determina tirul toxinei. Unitatea de măsură a puterii antitoxice *in vitro* a toxinei difterice este Lf, *limes floculans*; 1 Lf floculează iniţial exact 1 U.A. În acelaşi mod se titrează şi anatoxina, întrucît acest mod de titrare *in vitro* se bizuie pe proprietăţile antigenice şi nu pe cele toxice. O bună anatoxină pentru vaccinare trebuie să conţină minimum 30 Lf/ml.

Serul antidifteric. În caz de difterie declarată, imunizarea activă cu ajutorul anatoxinei, practicată în momentul apariţiei bolii, este ineficientă, deoarece anticorpii apar abia după 3 săptămîni. Cum toxina difterică elaborată de bacili în timpul bolii acţionează foarte rapid, trebuie să intervenim prin neutralizarea ei înainte de a se fixa pe ţesuturi. Această neutralizare o realizăm prin imunizarea pasivă cu ajutorul serului antidifteric, care conţine antitoxina difterică. Serul antidifteric se obţine de la cai, prin hiperimunizarea cu anatoxină difterică. Pentru a fi eficient, serul trebuie administrat cît mai la începutul bolii, în concentraţie suficientă. Serul se administrează în cantităţi între 1 000 şi 4 000 U.A./kilocorp, în funcţie de gravitatea bolii şi de momentul intervenţiei. Determinarea concentraţiei în antitoxină a serului se face prin titrarea *in vitro* şi *in vivo*. Titrarea *in vitro* a serului se bazează pe acelaşi principiu al floculării iniţiale, folosind o toxină cu titrul cunoscut. Unitatea de măsură a puterii antitoxice a serului antidifteric este unitatea antitoxică (U.A.).

Reacţia Schick. Este o reacţie biologică, de neutralizare a toxinei de antitoxină şi serveşte în practică la depistarea sensibilităţii indivizilor faţă de difterie. Indivizii care nu posedă în sîngele circulant antitoxina difterică sînt indivizi susceptibili sau receptivi faţă de difterie; ei reacţionează la inocularea intradermică a unei cantităţi de toxină difterică reprezentînd 1/50 D.L.M., conţinută în volumul de 0,2 ml, printr-o reacţie locală, congestivă şi uneori edem la locul de inoculare, de dimensiuni diferite. Reacţia Schick se foloseşte şi pentru controlul eficacităţii vaccinărilor în colectivităţile de copii. Într-o capanie reuşită de vaccinare, reacţia Schick se negativează în proporţie de 98—99%.

Tehnica reacţiei. Se introduce, pe faţa anterioară a unui antrebraţ, pe cale intradermică, 0,2 ml toxină Schick, care conţine 1/50 D.L.M. La antrebraţul opus se introduce aceeaşi cantitatea de toxină, inactivată la 85°, timp de o jumătate de oră, drept martor.

Interpretare. Reacţia se citeşte începînd după 48 de ore. A doua lectură se face la 6 zile. Pot exista 4 categorii de rezultate:

Reacţia pozitivă: o reacţie cu aspect de cocardă la antrebraţul cu toxină după 48 de ore. Lipsă de reacţie la antrebraţul martor. Individul este susceptibil. Aceasta denotă că el posedă în sînge o cantitate de antitoxină mai mică decît cea necesară pentru neutralizarea unei cantităţi de 1/50 D.L.M. toxină difterică.

După întinderea şi intensitatea reacţiei o notăm cu:

+++, dacă diametrul reacţiei este mai mare de 20 mm + cocarda;
++, dacă diametrul reacţiei este de 12—20 mm;
+, dacă diametrul reacţiei este de 12 mm;
±, dacă diametrul reacţiei este mai mic de 10 mm.

Reacţia negativă: lipsa de reacţie la ambele antebraţe. Individul este imun, nesusceptibil.

Reacţie pozitivă combinată: ambele antebraţe reacţionează chiar din prima zi, datorită proteinelor nespecifice bacteriene, faţă de care individul este sensibilizat. La antebraţul cu toxina martor reacţia dispare după 2 zile. La antebraţul cu toxina activă Schick, reacţia se menţine după 48 de ore. Individul este sensibil — receptiv — pentru difterie şi este alergic (sensibilizat) faţă de proteinele nespecifice.

Pseudoreacţia pozitivă : reacţia se produce la ambele antebraţe, din prima zi şi dispare la ambele după 48 de ore. Individul este Shick-negativ, dar alergic faţă de proteinele nespecifice.

Indivizii Schick-pozitivi, deci receptivi faţă de difterie, se vaccinează obligatoriu cu anatoxină difterică. Dozele iniţiale pentru vaccinare cu anatoxină nativă sînt 0,5 ml pînă la 1—1,5 ml, practicate la 3 şi 2 săptămîni interval.

Vaccinarea se face la vîrsta de 6 luni—1 an, iar revaccinarea la vîrsta de 3 ani şi 7 ani, cu cîte 1 ml (injecţie de *rapel*). În cazul anatoxinei purificate şi adsorbite (A.D.P.A.), se fac 2 injecţii cu cîte 0,5 ml, la interval de 4 săptămîni. Revaccinarea se face cu 0,5 ml după 6 luni, la vîrsta de 3 ani şi 7 ani. Copiii se vaccinează obligatoriu, iar adulţii, numai în funcţie de reacţia Schick.

Reacţia Moloney. S-a observat că prin vaccinarea copiilor mari şi adulţilor cu anatoxină difterică, se obţin în unele cazuri, reacţii supărătoare, manifestate sub forma unor reacţii locale şi generale, datorită sensibilizării indivizilor respectivi faţă de proteinele bacilului difteric cu care au venit în prealabil în contact, în decursul vieţii. Datorită existenţei acestor indivizi hipersensibili, este necesar ca vaccinarea la adult să se facă numai după testarea acestei stări de sensibilizare alergică. Depistarea stării de sensibilizare se face cu ajutorul reacţiei Moloney. Se introduce subcutanat 0,2 ml anatoxină difterică diluată 1/10. Dacă reacţia are diametrul mai mic de 1 cm este negativă, iar indivizii se pot vaccina în mod obişnuit. Dacă este mai mare de 1 cm, reacţia este pozitivă şi indivizii vor fi vaccinaţi cu doze mici, repetate, pînă la totalul dozei de vaccin. Reacţia Moloney se practică la indivizii care au depăşit vîrsta de 12—15 ani.

Diagnosticul purtătorilor de bacili difterici

După o infecţie difterică, convalescenţii elimină timp de 2—3 săptămîni bacili difterici; un număr redus dintre ei devin însă purtători cronici. În colectivităţile infectate şi în focarele endemice şi în epidemii există totdeauna un număr mare de purtători sănătoşi şi convalescenţi. Din punct de vedere epidemiologic, purtătorii de toate categoriile sînt acei care întreţin şi transmit boala; ei trebuie diagnosticaţi şi sterilizaţi prin tratament.

La purtători, problema cea mai importantă este izolarea microbului, diferenţierea lui de difterimorfi şi stabilirea caracterelor de toxigenitate a tulpinii izolate.

Spre deosebire de bolnavi, unde b. difterici sînt mai numeroşi în produsele patologice, la purtători este necesar să creăm condiţii speciale de dezvoltare a bacililor difterici, care se găsesc în cantitate mică în produsul patologic.

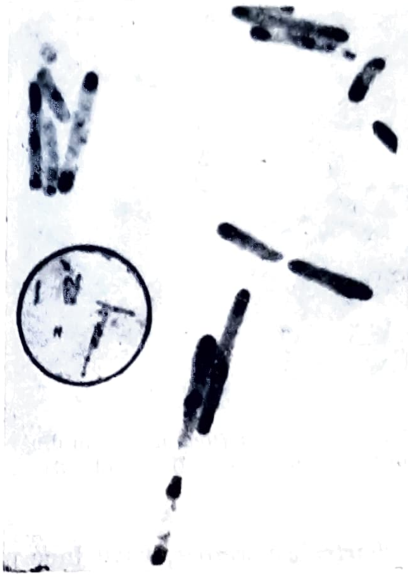


Fig. 313. — *C. diphtheriae*, imagine comparativă a corpusculilor metacromatici Babeş-Ernst la microscopul optic şi la microscopul electronic (adaptare după Winkler).

Izolarea microbului. Tamponul cu exsudat faringian şi nazal, recoltat de la purtători, se însămînţează în mediul de îmbogăţire O.C.S.T., care conţine bulion cu ou, cistină, ser şi telurit de K, prin introducerea directă a tamponului în cîte o eprubetă care conţine 2—3 ml mediu. Se incubează 14—16 ore la termostat şi apoi se fac treceri de izolare pe mediul Clauberg. Coloniile care fermentează glucoza pe Clauberg sînt trecute apoi pe ser Löffler, pentru a fi studiate complet din punct de vedere morfologic, tinctorial, biochimic, şi al toxinogenezei *in vivo* şi *in vitro*.

Identificarea microbului şi diferenţierea lui de difterimorfi. Din genul *Corynebacterium* mai fac parte, în afară de bacilul difteric, şi o serie de alţi microbi înrudiţi, nepatogeni, saprofiţi ai tegumentelor şi mucoaselor, care ne îngreunează diagnosticul speciei *Corynebacterium diphtheriae*.

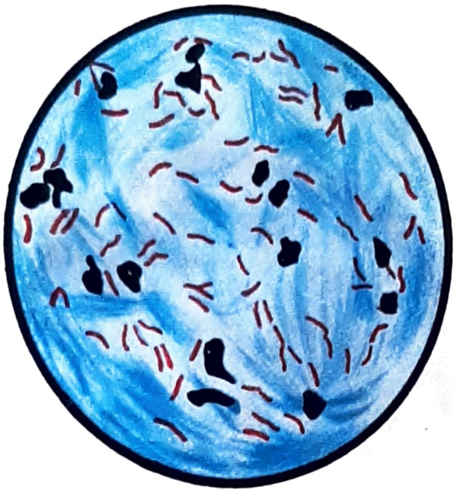


Fig. 316. — ***Mycobacterium tuberculosis*** **într-un produs patologic (spută).**

Cei mai importanţi difterimorfi care trăiesc în stare de parazitism comensal în organismul uman sînt :

— *Corynebacterium hoffmanni*, denumit şi bacilul pseudodifteric, care face parte din flora normală a mucoasei nazale şi faringiene ;

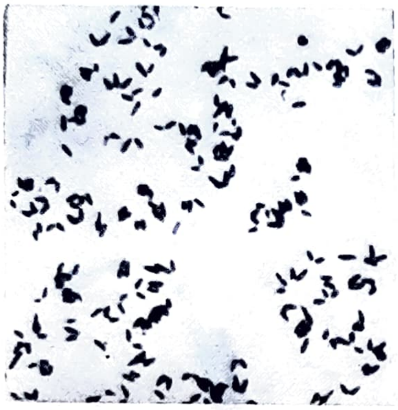


Fig. 314. — *C. hoffmanni*, frotiu din cultură pe mediul Löffler (coloraţie Gram).

— *Corynebacterium xerose*, care face parte din flora mucoasei conjunctivale şi ajunge, o dată cu lacrimile, în nazofaringe ;

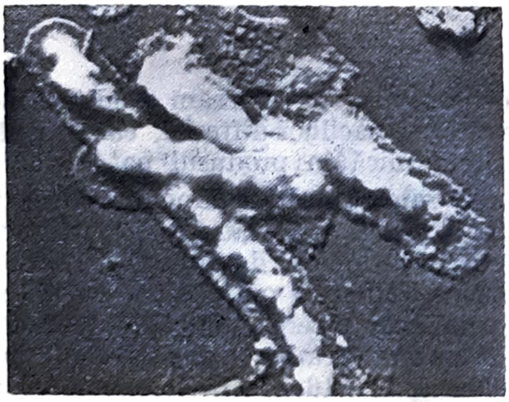


Fig. 315. — *C. diphtheriae*, tulpina P. W_8, imagine electronică × 13 000. Se vede structura internă şi corpusculii Babeş-Ernst (Laboratorul de microscopie electronică al Institutului „Dr. I. Cantacuzino").

— *Corynebacterium cutis commune*, care face parte din flora normală a tegumentelor şi mucoasei rino-faringiene.

Din punctul de vedere al caracterelor morfologice, diferenţierea cu difterimorfii se poate face numai cu *C. hoffmanni*, care are capetele ascuţite şi o formă de bob de orz şi se aşază în palisade. Cum în ultimul timp şi mai ales la purtătorii de microbi, se întîlnesc tot mai mult forme atipice, cocoide, cocobacilare, de bacili difterici, datorită antibioticelor, criteriile morfologice de deosebire între difterici şi difterimorfi şi-au pierdut din valoare. Colorabilitatea bacilului difteric la limită cu coloraţia Gram rămîne un criteriu bun, deoarece toţi difterimorfii sînt Gram-stabili. Prezenţa corpusculilor metacromatici Babeş-Ernst rămîne caracteristică pentru bacilul difteric ; există însă tulpini de difterimorfi care posedă şi ei corpusculi Babeş-Ernst.

Testele biochimice şi caracterele de cultură ne ajută mult la diferenţiere. Bacilii difterici se dezvoltă cu prioritate pe mediul de elecţie Löffler, iar difterimorfii necesită 20—24 de ore pentru a-şi dezvolta coloniile. Însămînţarea prin înţepare pe geloză dreaptă, asociată cu proba cistinazei, permite evidenţierea creşterii aerobe şi microaerofile a diftericilor, cu producere de H_2S şi creşterea exclusiv la suprafaţă (aerobă) a difterimorfilor, fără elaborare de H_2S. Un alt criteriu de diferenţiere se bazează pe spectrul fermentativ al glucozei, zaharozei, maltozei şi levulozei : C. *diphteriae* fermentează glucoza, levuloza şi maltoza ; *C. xerose*, glucoza, zaharoza, levuloza şi maltoza ; *C. cutis commune*, glucoza, zaharoza şi maltoza, iar *C. hoffmanni* nu fermentează nici un zahăr.

Un test biochimic foarte important pentru diferenţierea diftericilor de difterimorfi este evidenţierea ureazei, prin acţiunea culturii de cercetat asupra unui substrat lichid de uree în soluţie tamponată. Testul se realizează astfel : se însămînţează o ansă din cultura de cercetat, cultivată 24 de ore pe mediu Löffler, în 0,5 ml soluţie 2% de uree tamponată la pH 7,2, se incubează la 37°, timp de 24 de ore, după care se adaugă 0,1—0,2 ml din reactivul Nessler. Reacţia pozitivă este indicată de o coloraţie ce variază de la galben la brun-roşcat, în funcţie de cantitatea de amoniac rezultată

TABELUL 113

Schema de fermentare diferenţială a zaharurilor

	Glucoză	Zaharoză	Levuloză	Maltoză
C. diphtheriae	+	—	+	+
C. hoffmanni	—	—	—	—
C. xerose	+	+	+	+
C. cutis commune	+	+	—	+

din descompunerea ureei de către urează. Ca martor al reacției se folosește o tulpină de bacil proteu, care este urează-pozitiv. Capacitatea de a scinda molecula de uree cu producere de amoniac o au numai difterimorfii; bacilul difteric nu posedă urează în echipamentul său enzimatic și va da totdeauna reacții negative. Cel mai sigur criteriu de diferențiere rămîne însă proba patogenității și toxigenezei *in vivo*, prin inoculare subcutanată la cobai, sau prin inoculare intradermică la iepure, dacă avem numeroase tulpini de cercetat. Proba toxinogenezei *in vitro* după tehnica Elek-Ouchterlony-Frobisher are o sensibilitate egală și completează pe cea a toxinogenezei *in vivo*. O tulpină de bacili difterici, izolată de la un purtător și dovedită patogenă și toxigenă *in vivo* și *in vitro*, confirmă ipoteza că purtătorul joacă un rol activ în întreținerea endemiei difterice și răspîndirea infecției. El trebuie supus unui tratament de sterilizare a stării de purtător, care în practică nu poate fi realizată cu ușurință. Se folosesc astăzi cîteva antibiotice și chimioterapice, în tratamentul purtătorilor de microbi, care dau rezultate relativ bune. Astfel nitrofuranul, sub forma de bomboane cu nitrofuran, cloramfenicolul, dar mai ales tirotricina, în badijonaje dintr-o suspensie de 5 mg/ml. Eritromicina este de asemenea foarte activă, dar are dezavantajul că necesită doze mari. Rămîne însă de discutat care este, din punct de vedere epidemiologic, situația purtătorilor de bacili difterici netoxigeni și nepatogeni pentru animal. Mult timp acești purtători au fost considerați ca fără importanță epidemiologică. O serie de cercetări din ultimii ani, printre care și cele ale acad. M. Ciucă și colaboratorilor, în țara noastră, au scos în evidență rolul inductor de toxigenitate al bacteriofagului omolog difteric și heterolog stafilococic asupra tulpinilor avirulente, netoxigene de bacili difterici. Aceste cercetări au determinat o restructurare a concepțiilor privind patogenia și epidemiologia difteriei și au dovedit că tulpinile avirulente, netoxigene, sînt în realitate potențial patogene, iar purtătorii de bacili difterici avirulenți, netoxigeni trebuie tratați pentru sterilizare în condiții similare cu purtătorii de tulpini toxigene-virulente.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIFTERIEI

Schema A

Produs patologic: exsudat faringian

- Se recoltează 2 tampoane cu exsudat faringian, eventual cu desprinderea unui fragment din falsa membrană.
- Se însămînțează direct cu tamponul 2—3 tuburi cu mediu Löffler. Se efectuează apoi 2 frotiuri directe cu tamponul, care se colorează cu Gram și pentru corpusculii Babeș-Ernst.
- Se însămînțează cel de al 2-lea tampon în mediul de îmbogățire lichid O.C.S.T.
- Se controlează macroscopic cu lupa coloniile pe mediul Löffler și microscopic prin frotiu colorat cu Gram și pentru corpusculii Babeș-Ernst.
- Se însămînțează o colonie izolată tipică pe 2 tuburi cu ser Löffler pentru a obține cultura pură și 1 tub cu bulion glucozat pentru elaborarea toxinei.

În cazul că însămînțările directe pe mediul de elecție Löffler nu au dezvoltat colonii tipice, facem dispersii din mediul de îmbogățire O.C.S.T. cu ansa pe suprafața a 3—5 tuburi cu ser Löffler sau pe suprafața unei plăci cu geloză-sînge.

- Se fac subculturi din cultura pură pe mediul Löffler, pe mediile Gundel-Tietz, Clauberg, în bulion pe mediul Hiss, pe geloză dreaptă cu cistină și subacetat de Pb, pe mediul cu soluție 2 % uree, pentru stabilirea caracteristicilor biochimice, de creștere și diferențiere cu difterimorfi.
- Se inoculează subcutanat 2 cobai cu cîte 2 ml cultură în bulion. Cobaiul martor a fost în prealabil imunizat cu ser antidifteric.
- Se execută proba de toxinogeneză *in vitro* prin metoda E.O.F. în paralel cu o tulpină de bacil difteric sigur toxigen.

Se eliberează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, biochimice și de toxigenitate ale tulpinii izolate.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIFTERIEI

Schema B

Produs patologic: exsudat faringian și nazal pentru decelarea purtătorilor de bacili difterici

- Se recoltează 2 tampoane cu exsudat, unul din faringe și unul de pe mucoasa nazală.
- Se însămînțează ambele tampoane în mediul de îmbogățire O.C.S.T.
- Se fac dispersii cu ansa din mediul de îmbogățire pe mediul Clauberg.
- Coloniile de culoare neagră cu un *halo* albastru în jur sînt controlate prin frotiuri colorate cu Gram și pentru corpusculi și subcultivate pe mediul Löffler și bulion pentru obținerea culturii pure.

— Din cultura pură se fac treceri pentru studiul caracterelor de creştere pe mediul Gundel-Tietz, al caracteristicilor biochimice, prin fermentarea zaharurilor pe mediul Hiss, şi pentru diagnosticul diferenţial cu difterimorfi prin testul ureazei şi cistinazei.
— Din cultură în bulion se face proba patogenităţii la 2 cobai.
— Din cultura pe mediul Löffler se efectuează proba toxinogenezei *in vitro* E.O.F., folosind ca martor o tulpină sigur toxigenă.

Se eliberează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, biochimice şi de toxigenitate ale tulpinii izolate care confirmă starea de purtător de bacili difterici.

BIBLIOGRAFIE

ANDREEVA G. V., POLIAKOVA Z. N. — Metodă indicatoare folosită pentru detectarea şi identificarea culturilor de bacili difterici, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1961, nr. 8, p. 26—29.

BAKANOV N. P., APANASENKO N. I. — Determinarea susceptibilităţii copiilor faţă de difterie prin metoda cutanată, Raportul I, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1958, nr. 6, p. 38—43.

BLOKHOV V. P., GNUCHEV N. N. — Folosirea simultană a unor medii de cultură drepte şi înclinate pentru detectarea purtătorilor de bacili Löffler printre indivizii sănătoşi, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1960, nr. 11, p. 79—80.

BELAIA N. S. — Problemele de diagnostic şi diagnostic diferenţial în difterie, *Vop. Ohrany Materin. Dets.*, 1961, nr. 6, p. 57—63, din *Probl. Pat. Inf.* din literatura sovietică de specialitate, 1961, nr. 6, p. 39—51, Acad. R.P.R., Institutul de Studii romîno-sovietic.

BELIKOVA-ALDAKOVA V. D., BLIUHEL N. F., JARIKOVA A. D., PERFILIEVA E. B., SOLOVIOVA N. A. — Cauzele care diminuă imunitatea de vaccinare contra difteriei, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1961, nr. 4, p. 14—19, din *Probl. Pat. Inf.* din literatura sovietică de specialitate, 1961, nr. 5, p. 58—67, Acad. R.P.R., Institutul de studii romîno-sovietic.

CALALB G., SARAGEA ALICE, MAXIMESCU PAULA, IEREMIA T., ŢAGA ŞTEFANIA — Studiu comparativ asupra metodelor de cercetare a toxigenităţii tulpinilor de *C. diphteriae*. *Microbiologia (Bucureşti)*, 1959, nr. 5, p. 429—438.

CALALB G., SARAGEA ALICE, IEREMIA T., MAXIMESCU PAULA, TUPA SANDA, STĂNICĂ ECATERINA, STOIAN CECILIA, ŢAGA ŞTEFANIA, GARTNER MAGDA — Contribution à l'étude des souches de *Corynebacterium diphteriae* isolées dans deux foyers endémo-épidémiques : types et formes de variation en rapport avec les systèmes phago-bactériens spécifiques et les particularités endémo-épidémiques locales, *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 1959, nr. 1, p. 33—47.

CIUCĂ M., SARAGEA ALICE, TUPA SANDA, IEREMIA T., CALALB G., POPESCU PRETOR I., MUSCAN S., MUSCAN AURELIA, BARBAT FLORICA, CRISTIAN DOINA — Fréquence des souches lysogènes de *Corynebacterium diphteriae* dans un milieu endémo-épidémique de diphtérie, *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 1957, nr. 1, p. 153—160.

CIUCĂ M., SARAGEA ALICE, MAXIMESCU PAULA, MEITERT EUGENIA, IEREMIA T., CALALB G. — Lysogénie et pathogénité dans la biologie du *Corynebacterium diphteriae*. Rôle inducteur du bactériophage diphtérique dans le procès de variation du bacille diphtérique de l'état d'avirulence vers la virulence-toxinogénèse. *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 1958, nr. 3—4, p. 613—626.

CIUCĂ M., CALALB G., SARAGEA ALICE, MAXIMESCU PAULA, STĂNICĂ ECATERINA, IEREMIA T., TUPA ALEXANDRA, MEITERT EUGENIA, STOIAN CECILIA — Eco-systèmes *Phage bactérie* et formes de variation de 566 souches de *Corynebacterium diphteriae*, d'origine épidémique. Distribution des différents types, *Arch. roum. Path. exp. Micribiol.*, 1960, nr. 1, p. 59—68.

DANILĂ P., — Diagnosticul bacteriologic al difteriei, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1957, nr. 2, p. 19—23.

DUMAS J. — Bactériologie médicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 802—804.

DEVIATOVA L. N. — Asupra caracteristicilor clinice şi bacteriologice ale purtătorilor de bacili difterici, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1957, nr. 12, p. 48—54.

FLEKSER S. I. — Perioada precoce a difteriei toxice, *Pediatria (Bucureşti)*, 1960, p. 26—32 din *Probl. Microb., parazit., epidemiol., imunol. şi boli cont.*, din literatura sovietică de specialitate, 1960, nr. 6, p. 78, Acad. R.P.R., Institutul de studii romîno-sovietic.

FROBISHER M. — Fundamentals of bacteriology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Londra, 1949, p. 742—751.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 618—650.

HALLMANN L. — Bakteriologie und serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 242—262.

IEREMIA T., MAXIMESCU PAULA — Bacteriologie medicală, sub red., prof. Nestorescu N. şi colab., Editura medicală, Bucureşti, 1961, p. 517—538.

KRAVCENKO N. A., LUGOVAIA L. V., SALNIKOVA G. P. — Studiu comparativ asupra unor metode folosite pentru determinarea toxigenităţii culturilor de bacili difterici pe medii nutritive solide, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1961, nr. 11, p. 33—38.

MACKIE T. J., MCCARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 362—374.

MUELLER H. J. —The diphteria bacilli and the diphteroids, din Bacterial and mycotic infections of man. R. Dubos, Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 222—243.

PASTERNAK N. A., BLUMENTAL K. V. — Importanţa metodelor noi pentru cercetarea bacteriologică în diagnosticul difteriei, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1961, nr. 4, p. 28—33 din *Probl. Pat. Inf.*, din literatura sovietică de specialitate, 1961, nr. 5, p. 67—77, Acad. R.P.R., Institutul de studii romîno-sovietic.

PASTERNAK N. A., BLUMENTAL K. V. — Semnificaţia metodelor noi de examen bacteriologic în diagnosticul difteriei, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1961, nr. 4, p. 28—32.

RELYVELD H. E. — Toxines et antitoxines diphtériques, Étude immunologique, Ed. Hermann, Paris, 1959.

SAPIRO S. L. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, sub red. Sinai G. I. şi Birgher O. G., Editura ştiinţifică, Bucureşti, 1952, p. 443—457.

SARAGEA ALICE, MAXIMESCU PAULA, IEREMIA T. — Diagnosticul bacteriologic al difteriei, *Microbiologia (Bucureşti)*, 1960, nr. 5, p. 455—469.

SCHNEERSON A. N. — Studiul toxicităţii tulpinilor de bacili difterici proaspăt izolaţi, prin metoda precipitării toxinei în geloză peptonată fosfatată, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1957, nr. 12, p. 43—48.

STITT E. R., CLOUGH W. P., BRANHAM E. SARA — Practical bacteriology, hematology and parasitology, ed. a 10-a, Ed. Blakiston, Toronto, 1948, p. 57—74.

ȚIMBALIST D. F., IVANOV V. A. — Achiziții noi în diagnosticul de laborator al difteriei, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1957, nr. 11, p. 148—151.

THOMPSON RUTH la VERNE — Microbiology and epidemiology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Londra, 1958, p. 399—406.

TOPLEY and WILSON'S — Principles of bacteriology and immunity, ed. a 4-a, Ed. Edward Arnold, Londra, 1955, vol. I, p. 536 — 564 și vol. II, p. 1 563—1 577, 1 599—1 600.

WHITBY L., HYNES M. — Medical bacteriology, ed. a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 217—238.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, p. 534—557.

VOLOVICI N. I., LEIKINA M. M. — O metodă a determinării virulenței *in vitro* a bacililor difterici și perspectivele ei, Comunicarea a II-a. Asupra metodei de determinare a virulenței bacililor difterici cultivați pe medii solide, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1957, nr. 3, p. 73—78.

YAGNITSKAIA E. G. — Toxigenitatea culturilor de bacili difterici izolate de la bolnavi și purtători, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1959, nr. 9, p. 19—23.

ZINSSER J. — Textbook of bacteriology, ed. a II-a, Ed. Appleton-Century, New York, 1957, p. 321—333.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU MICOBACTERII

DIAGNOSTICUL INFECȚIEI TUBERCULOASE

Familia : *Mycobacteriaceae*. Genul : *Mycobacterium*. Specia tip : *Mycobacterium tuberculosis*

Generalități

Micobacteriile sînt microbi larg răspîndiți în natură sub formă saprofită și patogenă. Caracterul comun al acestor microbi în formă de bastonașe subțiri este acidoalcoolorezistența. Speciile patogene se deosebesc de cele saprofite prin adaptarea lor parazitară strictă la țesuturile gazdei și dezvoltarea lentă. Speciile saprofite se dezvoltă repede pe toate mediile uzuale de cultură, cele patogene cresc anevoios și lent numai pe medii complexe în prezența anumitor aminoacizi și factori de creștere.

Infecțiile la om sînt determinate de bacilul tuberculozei cu cele 2 varietăți : umană și bovină, precum și de bacilul leprei umane.

Mycobacterium leprae, agentul patogen al leprei umane, descoperit de Armauer Hansen, în anul 1868, a fost primul microb acidorezistent patogen cunoscut. În 1882, Robert Koch descoperă agentul cauzal al tuberculozei mamiferelor : *Mycobacterium tuberculosis*. În anii următori s-au deosebit cele două tipuri : *Mycobacterium tuberculosis hominis* și *Mycobacterium tuberculosis bovis*. Urmează apoi descoperirea tipului *aviar*. Între 1889 și 1905 sînt descrise tipurile de bacili tuberculoși, patogeni pentru animalele cu sînge rece : *Mycobacterium ranae* (broască), *Mycobacterium tropidonatom* (șarpe), *Mycobacterium chelonei* (broască țestoasă), *Mycobacterium piscium* (pești). În 1895, Johne și Frothingham identifică agentul patogen al enteritei hipertrofiante a bovideelor : *Mycobacterium paratuberculosis bovis* (bacilul Johne). În 1903, la Odesa, Stefanski descoperă bacilul leprei murine (șobolanilor) : *Mycobacterium leprae muris*. În sfîrșit, ulterior sînt identificați numeroși *bacili acidorezistenți saprofiți* (în sol, în ape, lapte, unt, secreții vegetale) : *Mycobacterium phlei* (plante), *M. smegmatis* (smegmă), *M. butiricum* (unt), *M. graminis* (graminee) etc. În ultimul timp Wells a descoperit un bacil acidorezistent patogen pentru unele rozătoare (*Microtus agrestis*), denumit *Mycobacterium tuberculosis muris* (*Vole bacillus*), al treilea tip de *Mycobacterium* patogen pentru mamifere.

Bacilii paratuberculoși. În natură trăiesc, foarte răspîndite, numeroase specii de bacili acidorezistenți nepatogeni (saprofiți), care sînt foarte asemănători morfologic și tinctorial cu bacilii tuberculozei. Cresc și pot fi izolați cu ușurință din sol, gunoaie de pe graminee, din produsele de origine animală, unt, lapte, din secrețiile umane și animale (urină, fecale, smegmă, mucus nazal), din ape (robinet, din fîntînă) etc. Acidorezistența lor este mai slabă decît a bacililor tuberculoși propriu-ziși ; de aceea nu rezistă la o decolorare prelungită cu acid sau cu alcool. Se dezvoltă ușor pe mediile uzuale și pe cele glicerinate, în 48—72 de ore la 20—37°.

Foarte adesea produc pigmenți, dezvoltînd colonii cromogene. Coloniile sînt mari, netede, polimorfe, asemănătoare cu cele ale bacilului aviar. Glicerina le favorizează cultivarea. Nu lichefiază gelatina, nu coagulează laptele și nu produc indol. Sînt saprofiți banali, lipsiți de patogenitate, chiar în doze relativ mari.

Habitat

Parazit obligatoriu, bacilul tuberculozei nu se dezvoltă în afara organismului animal. Tipurile uman, bovin și murin parazitează mamiferele, cel aviar este patogen în special pentru păsări, mai puțin pentru porc și incidental pentru vacă. Tipurile patogene pentru animalele cu sînge rece provoacă boala la aceste animale. Acidorezistenții saprofiți au o largă răspîndire în natură (iarbă, alimente, secreții, fecale etc.), prezența ionilor metalici părînd să le favorizeze dezvoltarea (apa de robinet, instrumentele muzicale de alamă etc.). Ei pot uneori contamina, pe cale aeriană, culturile, expunînd la erori de diagnostic. Bacilul leprei umane este un parazit strict al omului, iar cel al leprei murine, un parazit al șobolanului. În sfîrșit, bacilul Johne infectează vacile și în mai mică măsură, oile.

Caractere morfologice

Bacilul tuberculozei se prezintă ca un bastonaș de 1—4 μ lungime și 0,3—0,6 μ lățime, variind deci ca dimensiuni (forme lungi, mijlocii și scurte). Tipul bovin este mai gros și mai scurt decît cel uman. Corpul bacilar este rectiliniu sau ușor incurbat, cu laturile mai mult sau mai puțin paralele, cu extremitățile ușor rotunjite, imobil, Gram-pozitiv, prezentînd uneori în interior granulații foarte refringente. Pe frotiuri bacilii apar, fie izolați, fie în grămezi în care sînt așezați paralel sau se întretaie în *X*, *V* sau *L*. Se colorează omogen sau segmentar, putînd alterna zone intens colorate cu altele clare. În organism, bacilii sînt în general mai lungi decît în culturi. Morfologia lor depinde însă, în mare măsură, de condițiile de cultivare. Prin tehnici speciale (metoda Fontes) se pot pune în evidență, în corpul bacterian, 1—6 granulații cromofile sau gramofile, ale căror semnificație și natură nu sînt încă bine lămurite. În colonii, bacilii sînt dispuși paralel unii față de alții, în sens longitudinal, alcătuind în ansamblu, niște benzi al căror aspect este de „mustăți'' (tipul uman), dispuse în „ochiuri de rețea''.

Spre deosebire de majoritatea celorlalți germeni, bacilul tuberculozei este greu permeabil pentru coloranții acizi sau bazici. De aceea, punerea lui în evidență s-a făcut tîrziu și numai după eforturi îndelungate. Koch a reușit, cel dintîi, să-l coloreze, după un contact de 24 de ore cu albastru de metilen alcalinizat. Ehrlich a căpătat rezultate mai bune folosind metilvioletul sau fucsina bazică, adăugînd și un mordant, apă anilinată. Tot el a evidențiat și rezistența la decolorare cu acid azotic diluat. Rindfleisch a înlocuit acidul cu alcool și încălzind colorantul, a obținut rezultate mai bune. În sfîrșit, Ziehl și Neelsen pun la punct tehnica, rămasă clasică pînă astăzi, pentru colorarea bacilului tuberculos, bazîndu-se pe proprietățile lui tinctoriale speciale: necesitatea de a-l trata cu un colorant energic la cald și după ce a fixat colorantul, de a-l diferenția, grație rezistenței la acțiunea decolorantă a acizilor minerali diluați și a alcoolului.

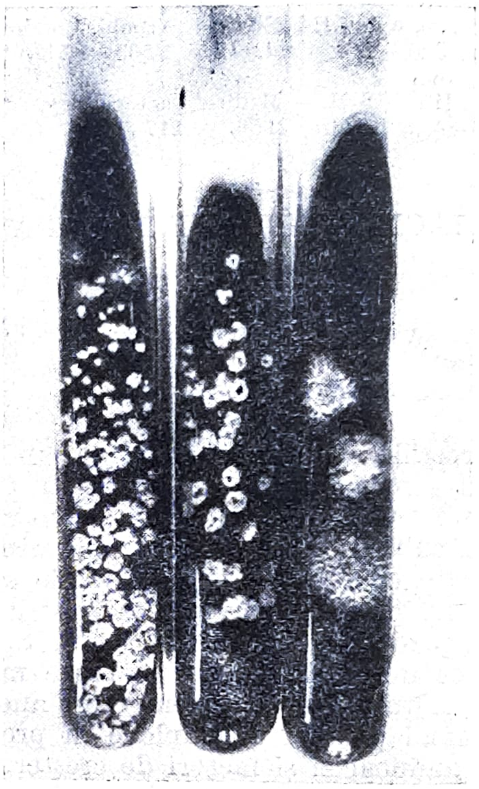


Fig. 317. — Colonii de micobacterii pe mediul Löwenstein : bacili umani (stînga), bovini (mijloc) și paratuberculoși (dreapta).

Colorarea acestor germeni se mai poate realiza și la rece, dacă se prelungește mult contactul cu colorantul sau dacă se adaugă substanțe care ușurează pătrunderea acestuia în corpul bacilar (tergitol etc.), sau corpi tensioactivi (*Tween 80*). În acest din urmă caz, colorația este și foarte rapidă (1—3 minute).

Se crede că acidorezistența ar fi datorită unei ceri nesaponifiabile din categoria alcoolilor superiori și pe care Tamura a denumit-o „mycol". S-a constatat că cantitatea de ceară cloroformosolubilă este proporțională cu rezistența la decolorare a germenilor și că bacilii tuberculoși propriu-ziși sînt mai bogați în această substanță decît cei saprofiți.

Cercetări mai recente, efectuate de Yegian și Vanderlinde, au arătat că culoarea roșie strălucitoare este datorită membranei citoplasmatice în care pătrunde colorantul din soluție. Prin modificarea integrității celulei bacteriene (fărîmițarea mecanică a celulelor bacteriene) acidorezistența poate dispărea. Unii autori au semnalat prezența în culturile tinere de bacili tuberculoși a unor mici bastonașe și granulații, care nu sînt acidorezistenți, rezultate probabil prin traumatizarea celulelor bacteriene, peretele celulelor tinere nefiind îndeajuns de solid pentru a proteja membrana semipermeabilă citoplasmatică, responsabilă de reținerea colorantului.

Caractere de cultură

Bacilii acidorezistenți saprofiți, ca și cei patogeni pentru animalele cu sînge rece, se dezvoltă ușor (în 2–3 zile), chiar pe mediile obișnuite (bulion, geloză). Bacilii tuberculoși patogeni pentru mamifere (tipul uman, bovin și murin) se dezvoltă încet, uneori foarte anevoie și numai pe medii speciale. Tipul aviar (patogen pentru păsări) face tranziție între aceștia din urmă și formele patogene pentru animalele cu sînge rece. Dezvoltarea micobacteriilor se face în condiții de aerobioză, ritmul lor de dezvoltare fiind proporțional cu tensiunea oxigenului din mediu și cu un optim de temperatură care variază de la un tip la altul : 37,5–38° pentru tipurile mamiferelor, 40–41° pentru tipul aviar, 18–37° pentru tipurile saprofite și cele patogene pentru animalele cu sînge rece. pH optim al mediului variază, de asemenea, după tip : pentru tipul uman pH = 7,4 – 8,0 pentru tipul bovin pH = 5,8 – 6,9, pentru tipurile patogene pentru animalele cu sînge rece pH = 6,2 – 7,7 etc. Prin subculturi repetate, bacilii se adaptează, devenind din ce în ce mai puțin exigenți, dar ritmul lor de dezvoltare continuă să rămînă totuși lent.

Primele încercări de cultivare pe medii artificiale au fost foarte anevoioase. Primul mediu pe care Koch a reușit să obțină culturi pure, plecînd de la tuberculi ramoliți și triturați, a fost serul coagulat de bou sau de oaie. Pe acest mediu, după 15–20 zile, s-au dezvoltat colonii care au putut fi trecute în serie și apoi s-a izbutit să se transmită infecția la cobai.

Ulterior, progrese însemnate au fost realizate prin introducerea în compoziția mediilor a glicerinei, a cartofului glicerinat, a sîngelui și a oului.

Între diferitele tipuri de micobacterii sînt deosebiri nete în ceea ce privește aptitudinea de a se dezvolta pe diferite medii artificiale. Astfel, pe cînd creșterea bacilului de tip uman este favorizată de prezența glicerinei în mediu, dînd culturi luxuriante (dezvoltare eugonică), dezvoltarea bacilului de tip bovin este inhibată. Numai după o adaptare prealabilă pe medii neglicerinate (ou coagulat, cartof simplu) dezvoltarea disgonică, lentă și săracă a tipului bovin se schimbă și se adaptează la o dezvoltare și pe medii cu glicerină. Ca și cel bovin, tipul murin se dezvoltă mult mai bine pe medii neglicerinate și, după numeroase treceri, poate fi adaptat și pe mediile cu glicerină. Tipul aviar se dezvoltă de la început luxuriant pe mediile glicerinate și, după treceri repetate, se poate chiar dispensa de prezența glicerinei. Mediile de cultură folosite pentru cultivarea bacililor tuberculoși sînt de 3 categorii : *medii de izolare* care convin pentru obținerea de culturi pure, plecînd de la organe sau produse patologice ; *medii de întreținere*, folosite în special pentru păstrarea tulpinilor o dată izolate, și *medii sintetice* sau „de adaptare", în care germenii se dezvoltă în condiții diferite de cele din organism.

Dintre mediile de izolare, în a căror compoziție intră substanțe organice complexe, cele mai folosite sînt mediile cu ou : Loewenstein, Jensen, Dorset (neglicerinat), Petroff, Petragnani ; primele două sînt cele mai sensibile și au și cea mai largă răspîndire în practică.

Printre *mediile de întreținere* citām : bulionul glicerinat (4–5%), care servește în mod curent și la prepararea tuberculinei ; cartoful glicerinat 4–5% ; geloza glicerinată etc.

Mediile sintetice, prin compoziția lor, îngăduie bacililor condiții de dezvoltare diferite de cele din organism, ceea ce duce uneori la unele modificări în morfologia și calitățile antigenice și de virulență ale germenilor. Aceste medii au o compoziție chimică bine definită și nu necesită adaosul unor factori de creștere. Cele mai folosite sînt : mediul Sauton, mediul Dubos, mediul Long și mediul Youmans.

Un progres însemnat a fost realizat de Dubos prin introducerea, la un mediu sintetic lichid, a unor substanțe care accelerează creșterea germenilor, făcîndu-i totodată, să se dezvolte dispers și omogen, în tot cuprinsul mediului. Aceste substanțe sînt :

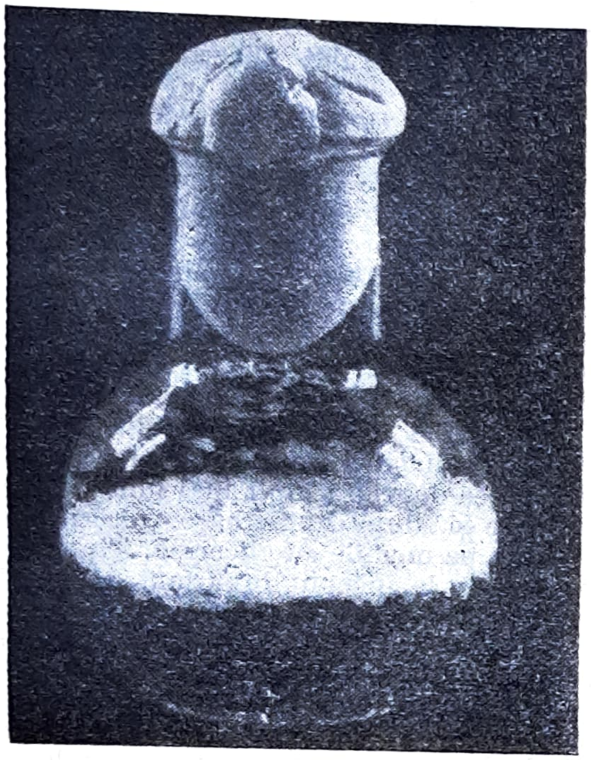


Fig. 318. — Mycobacterium tuberculosis hominis. Cultură pe mediul Sauton ; formarea membranei caracteristice tipului uman (colecția autorului).

1. un ester al acidului oleic, monooleatul de sorbitan, cu numele comercial *Tween 80*, solubil în același timp în apă și grăsimi, care permeabilizează membrana bacilară, făcînd corpul bacilar hidrofil. Concomitent, printr-o acțiune tensioactivă asupra suprafeței lichidului de cultură se favorizează o dispersie omogenă și o creștere rapidă și uniformă ;
2. o albumină serică, fracțiunea a V-a de serumalbumină bovină, care neutralizează acțiunea toxică a fracțiunilor de acizi grași eliberați prin hidroliza *Tween*-ului.

Pe mediile solide, coloniile bacililor tuberculoși de tip uman apar după 10—14 zile, sub forma unor puncte albe, care se măresc și fuzionează. Coloniile de tip bovin apar mult mai tîrziu (30—70 de zile). Cele de tip aviar apar, în schimb, foarte precoce (7—12 zile), se dezvoltă repede, dînd o masă gleroasă, netedă, cremoasă, caracteristică. Un caracter comun al culturilor de germeni acidorezistenți îl constituie consistența și friabilitatea coloniilor, precum și adezivitatea lor de suprafața mediului pe care s-au dezvoltat. Astfel, coloniile de tip uman nu sînt puternic aderente de mediu și se emulsionează greu în soluție clorurosodică 8,5‰ ; cele de tip bovin sînt aderente de mediu și mai ușor emulsionabile în soluție clorurosodică 8,5‰. Bacilii paratuberculoși dau coloniile cele mai precoce și abundente, vizibile macroscopic chiar după 48—72 de ore. Pe mediile lichide bacilii tuberculoși se dezvoltă la suprafață sub forma unei membrane, la început fină, care se îngroașă treptat, se întinde progresiv pe toată suprafața mediului, pînă cînd o acoperă complet, ridicîndu-se uneori cu 1—2 cm și pe pereții balonului. Pe măsură ce se îngroașă, membrana se și încrețește, lăsînd însă mediul limpede și clar. Ajunsă la dezvoltarea ei maximă, membrana groasă și vălurită cade la fund prin propria ei greutate, iar din fragmentele rămase la suprafață se dezvoltă o nouă membrană. Bacilii de tip uman fac o membrană mai groasă, care se întinde mai repede, pe cînd cei de tip bovin formează, de obicei, una subțire și cu o dezvoltare mai înceată.

Pe aceste medii, bacilii de tip uman alcalinizează, la început, mediul și apoi îl acidifică în cursul dezvoltării, spre deosebire de tipul bovin, care îl alcalinizează, fără acidificare ulterioară. Pentru diferențierea între tipul uman și cel bovin, prin caracterele lor de cultură, este nevoie de însămînțări pe mediile solide și lichide, cu și fără adaos de glicerină. Trebuie ținut seama că deosebirile între aceste două tipuri nu sînt nete, decît atunci cînd se pornește de la bacili recent izolați.

În ultimii ani s-a imaginat o nouă tehnică pentru cultura rapidă și directă a bacililor tuberculoși din produsele patologice bacilifere : metoda culturilor pe lamă.

Se pregătesc lame înguste, confecționate prin tăierea în două, în sens longitudinal, a lamelor obișnuite. Se întind pe aceste lame frotiuri din produsul patologic de examinat, care sînt uscate la aer, fără a le fixa prin căldură. Lamele sînt apoi ținute timp de 8—10 minute într-o soluție de acid sulfuric 4—6%, fără a se agita. Apoi sînt trecute prin două cutii Petri cu apă distilată sterilă, spre a se spăla excesul de acid și sînt introduse în tuburi care conțin mediul Youmans, Dubos sau numai sînge citratat la care s-a adăugat un volum egal de apă distilată. Tuburile se incubează la termostat (37,5°), timp de 7—8 zile, apoi se scot, iar lamele cu frotiuri, pe care s-au dezvoltat eventuale colonii, se fixează cu grijă la flacără și se colorează după metoda Ziehl-Neelsen.

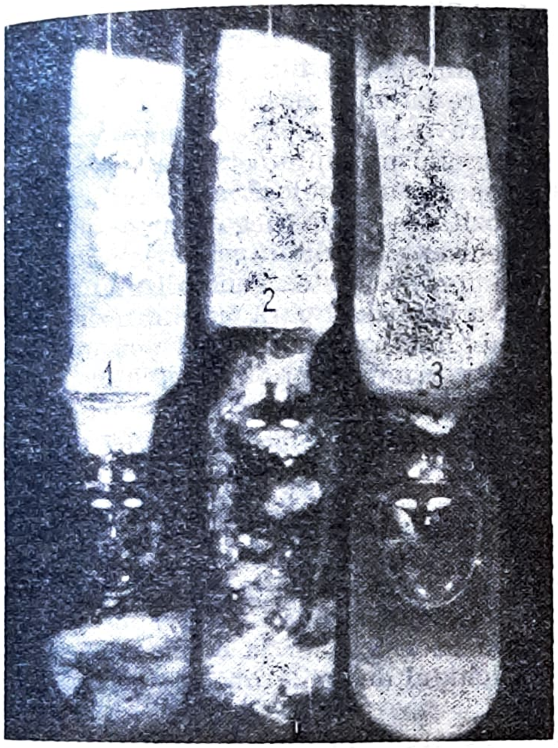


Fig 319. — Mycobacterium tuberculosis hominis. Culturi pe cartof glicerinat : 1 — tipul bovin, tulpina Vallée; 2 — tipul uman, tulpina $H_{37}Rv$; 3 — tipul aviar, tulpina G.

Culturile pe lamă dau rezultate rapide (8—10 zile), însă pot fi folosite numai pentru produsele relativ bogate în bacili. Metoda aduce mari servicii, mai ales pentru determinarea rapidă a sensibilității bacililor tuberculoși la antibiotice, prin adăugarea acestora, în concentrații crescînde, în tuburile cu mediu.

Sensibilitatea la antiseptice, antibiotice și chimioterapice

Deși nesporulat, bacilul tuberculos este un germen relativ rezistent la acțiunea diferiților agenți fizico-chimici. Sub acțiunea căldurii, creșterea bacililor din culturi se oprește în jurul a 42°, pentru a se ajunge la omorîrea lor după 10 minute la 70°. În stare uscată rezistă timp de 7 ore la 70°; la lumină difuză și la temperatura camerei, germenii pot rămîne vii 40 de zile și mai mult chiar, dacă sînt păstrați la adăpost de lumina solară. În stare umedă (suspensie în apă distilată sau în ser fiziologic), bacilii mor după 12 ore la 50°; după 4 ore la 55°; după o oră la 60°; după 15 minute la 65°; după 10 minute la 70°; după 5 minute la 80° și după un minut la 95°.

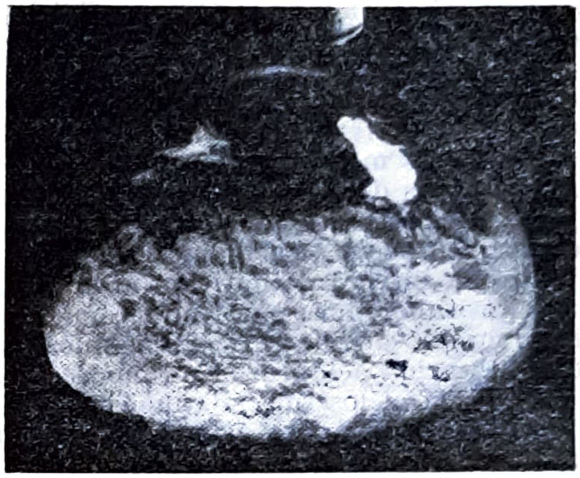


Fig. 320. — Mycobacterium tuberculosis bovis. Cultură pe mediul Sauton, formarea membranei caracteristice tipului bovin.

În produsele patologice, în special în spută, rezistența lor crește considerabil : rezistă o jumătate de oră la peste 75° și 5 minute la 100°. În lapte, bacilul tuberculos moare după 10 minute la 70°. Lumina solară este foarte activă : la expunerea directă și în strat nu prea gros, sterilizarea se obține după 2 ore. Astfel, bacilii din sputele bolnavilor, care au zăcut în camere luminoase și aerate, sînt distruși după aproximativ 2 săptămîni, dar pot rămîne patogeni luni și chiar ani de zile, dacă încăperea este întunecoasă. În praful străzilor, birouri și localuri publice, bacilii rămîn vii pînă la 10 zile. Pe haine și în cărți persistența viabilității este mai îndelungată, putînd ajunge pînă la 3 luni. În cadavrele infectate și îngropate supraviețuirea germenilor este foarte lungă, putînd ajunge pînă la ani de zile. În apele reziduale și în pămîntul umed, de asemenea, vitalitatea se conservă mult.

Acțiunea antisepticelor variază mult de la un preparat la altul și după natura produsului bacilifer. Astfel acidul fenic 5% omoară bacilul tuberculos după 5 minute de contact; sublimatul 1%, după o oră, iar 1‰, după 24 de ore; tricrezolul 1%, lizolul 2% și formolul 1%, după o oră. În produsele patologice, fenolul 5% distruge germenul după 24 de ore de contact, iar tricrezolul 2%, lizolul 4% și formolul 1%, după 48 de ore.

Bacilul tuberculos s-a arătat sensibil la acțiunea bacteriostatică a unor substanțe antibiotice naturale și de sinteză, care, acționînd asupra metabolismului normal al germenului, îl modifică în așa fel, încît îi împiedică multiplicarea. În acest mod, el poate fi mai ușor fagocitat și distrus de elementele fagocitare din organism. Antibioticele și chimioterapicele cu acțiune specifică asupra bacilului Koch, care și-au făcut proba intrînd definitiv în arsenalul terapeutic antituberculos, sînt: streptomicina, acidul paraaminosalicilic (PAS), tiosemicarbazona (TB_1), hidrazida acidul izonicotinic (H.I.N.) iar în ultimii ani cicloserina și viomicina. Pe lîngă acțiunea lor inhibitoare asupra dezvoltării bacilului tuberculos, de dezintoxicare a organismului și toxicitate proprie minimă, antibioticele prezintă, în anumite cazuri, dezavantajul rezistenței, pe care o poate cîștiga cu destulă ușurință bacilul față de acțiunea lor. Dar prin administrarea asociată a mai multor antibiotice s-a redus mult din riscul instalării rezistenței germenului față de antibiotice. Neajunsul cel mai important a rămas impermeabilitatea anumitor țesuturi afectate față de antibiotice (leziunile cazeoase, unele caverne, țesuturi cerebrale etc.). De aceea, antibioticele nu pot realiza cu siguranță sterilizarea organismului, făcînd astfel necesare și tratamentele clasice: cura de repaus (igienodietetică) și colapsoterapia (medicală și chirurgicală).

a) *Streptomicina.* Este bacteriostatică față de bacilul tuberculos, într-o concentrație de 0,5 γ/ml. Are o toxicitate redusă și o difuzibilitate bună în organism, cu excepția sistemului nervos central. Dă cazuri de rezistență, proporțional cu dozele administrate și în raport cu natura leziunilor; rezistența se reduce parțial prin asocierea altor antibiotice.

b) *Acidul paraaminosalicilic* (PAS) inhibează *in vitro* creșterea bacilului tuberculos într-o concentrație de 0,1—0,5 γ/ml. Are acțiune bacteriostatică numai asupra bacilului Koch, nu și asupra altor specii microbiene.

c) *Tiosemicarbazona* (TB_1) are acțiune bacteriostatică asupra bacilului Koch în diluții de 0,3—0,5 γ/ml (1/250 000). Are o acțiune lentă și un grad pronunțat de toxicitate proprie.

d) *Hidrazida acidului izonicotinic* (H.I.N.) este cel mai puternic preparat intrat în arsenalul chimioterapic antibacilar. Acțiunea bacteriostatică asupra bacilului tuberculos de tip uman este de 0,02—0,05 γ/ml. Toxicitatea este practic nulă, iar difuzibilitatea în țesuturile organismului, foarte mare (activă în meningite, administrată fiind pe cale orală). În schimb, rezistența germenilor se poate instala rapid. Are o puternică acțiune dezintoxicantă asupra organismului infectat. Introducerea antibioticelor în tuberculoză a scăzut considerabil contagiozitatea bolii (negativarea multor forme deschise) și a diminuat mortalitatea (meningite, forme acute generalizate etc.); în schimb, a făcut să apară tulpini rezistente care, infectînd indivizi sănătoși, îi pot priva de beneficiile tratamentului cu antibiotice.

Diagnosticul de laborator al infecției tuberculoase

Produsele patologice în care se va căuta prezența bacililor tuberculozei sînt variate, datorită multiplelor posibilități de localizare ale acestor bacterii. Astfel se vor cerceta:

1. în tuberculoza pulmonară, sputa, lichidul de spălătură bronșică, iar la copii, deoarece înghit sputa, lichidul de spălătură gastrică și materiile fecale;

2. în tuberculoza renală, urina;

3. în meningita tuberculoasă, lichidul cefalorahidian;

4. în pleurezii, lichidul pleural;

5. în peritonitele tuberculoase, lichidul peritoneal.

Din toate aceste produse patologice, primul loc, datorită frecvenței și importanței, îl ocupă sputa.

Examenul sputei

a) Modul de prelevare: sputa se recoltează în recipiente de porțelan sau sticlă cu capac. Sputa se recoltează de preferință dimineața, cînd bolnavul își face toaleta bronșică.

b) Examenul morfologic: se alege din spută un fragment purulent care se întinde pe lamă. După uscare și fixare se colorează după metoda Ziehl-Neelsen. Căutarea bacililor Koch prin această metodă se sprijină pe proprietățile lor tinctoriale speciale; tratarea bacililor cu un colorant energic la cald și după ce au fixat colorantul, proprietatea lor de a rezista acțiunii decolorante a acizilor minerali diluați (care decolorează toţi ceilalţi germeni, cu excepţia bacilului tuberculos), precum şi acţiunii decolorante a alcoolului le-a atras denumirea de microbi acidoalcoolorezistenţi. Frotiul, uscat şi fixat prin flambare, se acoperă mai întîi cu fucsină fenicată Ziehl.

Frotiul acoperit cu fucsină se încălzeşte uşor, cu flacăra unui bec de gaz sau cu un tampon de vată îmbibată cu alcool, pînă la emisiune de vapori. Se repetă încălzirea de cîteva ori, cu precauţia de a evita fierberea fucsinei, altfel colorantul precipită pe lamă, bacilii se alterează, fixează rău colorantul şi corpul bacilar devine uşor decolorabil; de asemenea, se va observa să nu se evaporeze fucsina de pe lamă, adăugînd, la nevoie, noi cantităţi de colorant şi împiedicînd astfel formarea de precipitate prin desicare. Se varsă colorantul şi se spală lama cu apă de robinet. Preparaţia spălată se decolorează cu un acid diluat: acid azotic 1 : 3 sau, mai bine, acid sulfuric 1 : 4, timp de circa 2 minute (preparaţia se decolorează). Se spală din nou cu apă de robinet, apoi se decolorează timp de 3—5 minute, cu alcool 95° şi se spală iarăşi cu apă. Timpul decolorării şi cu alcool nu este obligatoriu şi în practică este omis deseori. Important este însă ca decolorarea preparatului să se facă complet, în aşa fel încît să nu rămînă insule de culoare roşie-roz. Se recolorează ,,de fond'' cu o soluţie apoasă sau alcoolică 1% de albastru de metilen, timp de cel mult un minut. Se recomandă ca recolorarea de fond să nu fie prea intensă, deoarece ar putea masca bacilii aflaţi în zonele mai groase ale frotiului. Se spală din nou cu apă de robinet şi se lasă să se usuce la aer. Metoda de colorare ,,la rece'' recomandă colorarea şi decolorarea bacililor în băi de colorant. În acest scop frotiurile se cufundă, mai întîi în soluţie de fucsină Ziehl dintr-un pahar Borrel, în care se păstrează cel puţin 3 ore sau, mai bine, pînă a doua zi. Apoi lamele se scot cu o pensă, se spală uşor la curent de apă şi se aşază apoi într-un pahar cu acid diluat pentru 5 minute. Se spală din nou uşor cu apă, se lasă încă 10 minute într-un pahar cu alcool şi după o nouă spălare uşoară cu apă se recolorează rapid, timp de 30 de secunde, cu albastru de metilen 1%.

Pentru a realiza o colorare mai rapidă la rece a bacililor acidoalcoolorezistenţi se pot adăuga, la soluţia de fucsină, substanţe cu efect detergent, care uşurează astfel pătrunderea colorantului în corpul bacilar. Se pot folosi, de pildă, următoarele formule: tergitol, în proporţie de 1 picătură la 30 ml soluţie de fucsină; laurilsulfat de Na, 2 picături dintr-o soluţie apoasă 2 % la 30 ml fucsină, sau *Tween 80*, în proporţie de 5 picături la 100 ml fucsină.

Pe cîmpul microscopic al preparatului de spută bacilii acidorezistenţi apar coloraţi în roşu intens, pe un fond albastru, prezentîndu-se izolaţi sau aşezaţi caracteristic în *V* şi *L*. Frecvenţa lor într-un frotiu nu constituie o indicaţie de gravitate clinică; singură prezenţa lor are valoare de diagnostic.

Uneori se pot întîlni forme bacilare scurte de aproximativ 1 μ, care se observă mai ales grupate în mici grămezi.

Cercetarea microscopică a sputei pentru baciloscopie este un examen mai laborios, pentru că frotiul trebuie căutat cu răbdare cel puţin timp de 5—10 minute, pe numeroase cîmpuri microscopice, înainte de a da un răspuns negativ.

În cazul în care nu s-au găsit bacili la examenul microscopic direct, răspunsul va evita totuşi negarea certă a absenţei lor. Nu se va spune niciodată: ,,în frotiul de spută examinat nu există bacili Koch'' ci doar ,,în frotiul de spută cercetat prin examen direct nu s-au găsit bacili acidoalcoolorezistenţi''.

Absenţa bacililor la examenul unui frotiu direct nu înseamnă că sputa este sigur negativă, întrucît porţiunea cercetată de noi pe frotiu reprezintă doar o cantitate extrem de mică: aproximativ 1 ml dintr-un volum de 10—20 ml de expectoraţie. De aceea, în cazurile în care un asemenea examen pe un preparat de spută paucibacilară, pentru care ar fi uneori necesare ore întregi de căutare pentru a găsi un bacil, arată o baciloscopie negativă, se recurge la metode speciale, prin care bacilii sînt concentraţi într-un volum foarte mic.

Aceste procedee pot mări de cîteva sute de ori şansele de decelare şi au fost denumite metode de ,,omogenizare''.

Metodele de omogenizare se bazează pe fluidificarea sputelor, urmată de concentrare în volum restrîns. Fluidificarea este rezultatul acţiunii alcalilor sau acizilor minerali diluaţi care, solubilizînd fibrina, eliberează bacilii. Pentru a colecta bacilii din sputele astfel ,,omogenizate'', trebuie să existe o diferenţă de densitate între corpul bacilar şi mediul care-i conţine, iar pentru separare se foloseşte obişnuit centrifugarea amestecului, care se bazează pe faptul că lichidul omogenizat este mai puţin dens decît bacilul.

Dintre numeroasele metode propuse în acest scop, vom reda pe cele care s-au arătat mai valoroase şi mai simple de aplicat în practica de laborator.

Omogenizarea alcalină. 1. Se iau 2 ml spută într-un recipient steril. Se adaugă 20 ml apă distilată sterilă şi 2 picături dintr-o soluţie de NaOH 40%. Se încălzeşte, timp de 10 minute, într-o baie de apă la fierbere, pînă cînd amestecul devine fluid şi omogen sau se agită cu perle de sticlă sau o baghetă de sticlă sterilă şi se lasă la termostat pînă a doua zi. Se transvazează apoi totul într-un tub de centrifugă, se adaugă 1/4 din volum-alcool de 50°, pentru a scădea densitatea amestecului, şi se centrifughează totul timp de 1 oră la 3 000 turaţii/min. Se decantează şi se aruncă lichidul supernatant, iar din depozitul obţinut se fac frotiuri pe lame bine degresate, nezgîriate şi curate, care se colorează după metoda Ziehl-Neelsen.

2. La circa 5 ml spută se adaugă 25 ml dintr-o soluţie de hidrat de sodiu 30%; se încălzeşte uşor într-o baie de apă la 60°, agitînd continuu cu o baghetă. Se adaugă apoi 15 ml apă distilată, continuînd încălzirea încă 10 minute. Se lasă să se răcească. Pentru a uşura sedimentarea, se recomandă adăugarea a 5 ml alcool de 50°. Se trece amestecul într-un tub de centrifugă steril şi se centrifughează timp de 30 de minute la 3 000 turaţii/ min. Se decantează supernatantul şi se examinează depozitul obţinut prin frotiu colorat Ziehl.

3. La circa 2 ml spută, se adaugă 2—8 ml antiformină (amestec în volume egale de hipoclorit de calciu şi hidrat de sodiu 15%). Se agită cu o baghetă de sticlă, pînă se obţine un amestec omogen. Se lasă la termostat o jumătate de oră, după care se centrifughează timp de 15—20 de minute. Se decantează lichidul supernatant şi se fac frotiuri din depozitul obţinut pe lame, la suprafaţa cărora s-a întins, în prealabil, un strat subţire de spută din recolta iniţială, pentru a face mai aderent depozitul pe lamă. Se colorează prin metoda Ziehl-Neelsen.

Omogenizarea acidă. Se tratează circa 2 ml spută, cu 2—8 ml acid sulfuric 15%; cantitatea de acid sulfuric care se adaugă este în funcţie de consistenţa sputei. Se agită puternic, lăsînd amestecul în contact timp de 15—20 de minute. Se centrifughează, se decantează supernatantul şi se spală depozitul de 3 ori succesiv cu ser fiziologic steril, apoi se fac frotiurile pe lamă.

Metoda sovietică de omogenizare prin flotaţie. Se colectează, timp de 2—3 zile, sputa de la bolnav într-un vas steril. Se adaugă un volum egal dintr-o soluţie 0,5% hidrat de sodiu şi se agită puternic, pînă la dispariţia completă a mucozităţilor şi grunjilor. Se trece amestecul într-un balon de sticlă cu gît îngust care se introduce într-o baie de apă la temperatura de 60°, timp de 30 de minute, continuînd să se agite, din cînd în cînd, pînă la fluidificare. Se adaugă apoi 2 ml xilol, se astupă cu dop şi se agită puternic conţinutul, timp de 10 minute. Acesta este timpul cel mai important al operaţiei, întrucît succesul depinde de gradul de dispersie a particulelor cu xilol; se adaugă apoi apă distilată, pînă cînd nivelul lichidului ajunge la partea superioară a gîtului balonului. Se lasă totul în repaus, cel puţin o oră, timp în care se va forma, spre suprafaţa lichidului, un strat cremos, alcătuit din particulele de xilol care antrenează toţi corpii bacilari din cuprinsul amestecului, concentrîndu-i la suprafaţă. Se acoperă baia de apă la 60° cu un geam, pînă cînd sticla ia temperatura băii; se poate folosi şi o platină încălzitoare pentru lame, reglată la 60°, se aşază pe ea cîteva lame degresate, pe care se notează numele bolnavului. Cu o pipetă Pasteur, înzestrată la un capăt cu o mică pară de cauciuc, se prelevă din stratul cremos 1—2 picături, care se depun pe lame, unde sînt lăsate să se usuce, după care se repetă operaţia, suprapunîndu-se astfel pînă la completa epuizare a stratului cremos. Aceste picături „multistratificate'' sînt degresate prin tratare cu eter, după care sînt fixate la flacără şi colorate după metoda Ziehl-Neelsen. Metoda este superioară celorlalte, pentru că permite colectarea totalităţii bacililor, dintr-un volum apreciabil de spută, care întrece pe cel folosit de obicei în procedeele curente de omogenizare, şi este aplicabilă cu succes şi pentru căutarea bacilului Koch în spălăturile gastrice. Examenele directe şi prin omogenizare nu sînt suficiente pentru decelarea bacililor tuberculoşi; se impune o completare a lor prin metode mai sensibile, metodele biologice.

Dacă examenul microscopic ne permite decelarea bacililor acidorezistenţi în produsele patologice, izolarea lor este posibilă numai prin însămînţări pe medii speciale şi inoculare la animal.

Însămînţările pe mediile speciale măresc mai ales şansele de decelare a bacililor tuberculoşi în produsele paucibacilare. Pentru acest scop se folosesc medii de cultură speciale cu ou, care astfel sînt mai sensibile şi oferă condiţii favorabile de creştere microbilor. În practică, dintre numeroasele medii de izolare a bacililor Koch se folosesc cel mai frecvent mediul Loewenstein şi mediul Jensen-Holm.

Însămînţarea sputei pe aceste medii se face după o prealabilă tratare cu acid, pentru a o fluidifica suficient şi pentru a elimina flora microbiană de asociaţie, care ar contamina mediul. Tratarea cu acid se face într-un pahar conic steril. După un contact de 15—20 de minute cu acid sulfuric 15%, se adaugă două picături de tinctură de turnesol şi se neutralizează cu o soluţie de hidrat de sodiu 30%, pînă cînd culoarea roşie virează spre albastru ametist. Însămînţarea se face cu o pipetă sterilă Pasteur, repartizînd cîte 6—12 picături de fiecare tub, folosindu-se pentru fiecare produs patologic cel puţin cîte 6—8 tuburi cu mediu. Tuburile se pun la termostat (37°) în poziţie înclinată, pînă la evaporarea lichidului, apoi sînt capuşonate sau parafinate. Ele sînt examinate zilnic în prima săptămînă, apoi săptămînal şi chiar dacă nu se observă apariţia de colonii, sînt păstrate în observaţie pînă la 3 luni. Tuburile în care s-au dezvoltat precoce colonii microbiene, care au rezistat acţiunii acidului sulfuric sau au fost contaminate în cursul însămînţării printr-o tehnică defectuoasă, se îndepărtează. În celelalte tuburi coloniile de bacili Koch apar, în general, după 10—14 zile.

Coloniile care se dezvoltă pot prezenta o morfologie variată. De cele mai multe ori ele se prezintă rugoase, plate, cu centrul proeminent sau în formă de rozetă, cu o depresiune centrală crateriformă şi de culoare cenuşie-gălbuie. Tipul uman de bacili tuberculoşi prezintă o creştere eugonică pe mediile cu glicerină. Tipul bovin este inhibat sau dă colonii mici, netede, care indică o creştere disgonică pe mediile glicerinate.

Din coloniile care apar pe mediile de cultură se efectuează frotiuri care se colorează cu Ziehl, pentru a ne asigura că sînt bacili acidorezistenţi.

Dacă după 10—14 zile nu apar colonii vizibile macroscopic şi bănuim că produsul conţine totuşi bacilii Koch, se practică o raclare a suprafeţei mediului cu ansa, examinînd pe lamă produsul de raclare; putem astfel descoperi eventuale microcolonii, care ne permit punerea unui diagnostic precoce.

În ultimii ani se discută tot mai mult problema *bacililor acidorezistenţi atipici* sau *cromogeni*, care se caracterizează printr-o creştere mai rapidă, pigmentogeneză intensă, caractere biochimice speciale şi patogenitate mai redusă pentru cobai.

În practica diagnosticului de laborator al tuberculozei, pentru izolarea bacililor din produsele patologice prin însămînţarea pe mediile de cultură uneori pot surveni dificultăţi privind diferenţierea bacililor acidorezistenţi saprofiţi, aşa-numiţii bacili paratuberculoşi, de bacilii tuberculoşi patogeni.

Aceste dificultăţi pot fi înlăturate folosind următoarele criterii de diferenţiere :

— *Folosirea temperaturii optime de creştere.* Bacilii tuberculoşi patogeni cresc la o temperatură optimă de 37—37,5°; temperatura de 39—40° le este defavorabilă. Bacilii paratuberculoşi se dezvoltă la temperaturi variate. Unele specii se pot dezvolta la 47—50°, altele la temperatura camerei (20°), iar altele au temperatura optimă de 37°, ca şi bacilii tuberculoşi, deci acestea pot scăpa testului de diferenţiere prin temperatură.

— *Folosirea testului insensibilităţii paratuberculoşilor faţă de PAS.* Se ştie că bacilii tuberculoşi umani şi bovini sînt inhibaţi de prezenţa unor cantităţi minime de 1 γ PAS/ml mediu de cultură, pe cînd cei paratuberculoşi rezistă bine. În acest scop, se fac diluţii de PAS în mediul Dubos, cu concentraţii 1, 10, 100 şi 1 000 γ/ml.

Se fac subculturi din tulpina de cercetat în acest mediu. Bacilii paratuberculoşi sînt inhibaţi abia de la concentraţii de 100 γ/ml. O singură obiecţie ar putea fi adusă acestui test : existenţa tulpinilor de bacili tuberculoşi patogeni rezistenţi la PAS; acest lucru este însă foarte rar întîlnit.

În caz că rezultatele testelor de mai sus nu apar satisfăcătoare pentru diferenţiere, se va folosi metoda cea mai sigură, preconizată de Hauduroy, prin care produsul patologic se injectează la 2 cobai. La unul injectarea produsului se face sub pielea coapsei, la celălalt, intraperitoneal, cu 2 ml ulei de parafină. Primul cobai se va tuberculiza dacă bacilii inoculaţi au fost acidorezistenţi tuberculoşi, iar cel de-al doilea va muri în aproximativ 10 — 12 zile, cu hipertrofia splinei şi false membrane, în caz că a fost vorba de bacili acidorezistenţi paratuberculoşi sau în interval de o lună cu leziuni clasice de tuberculoză.

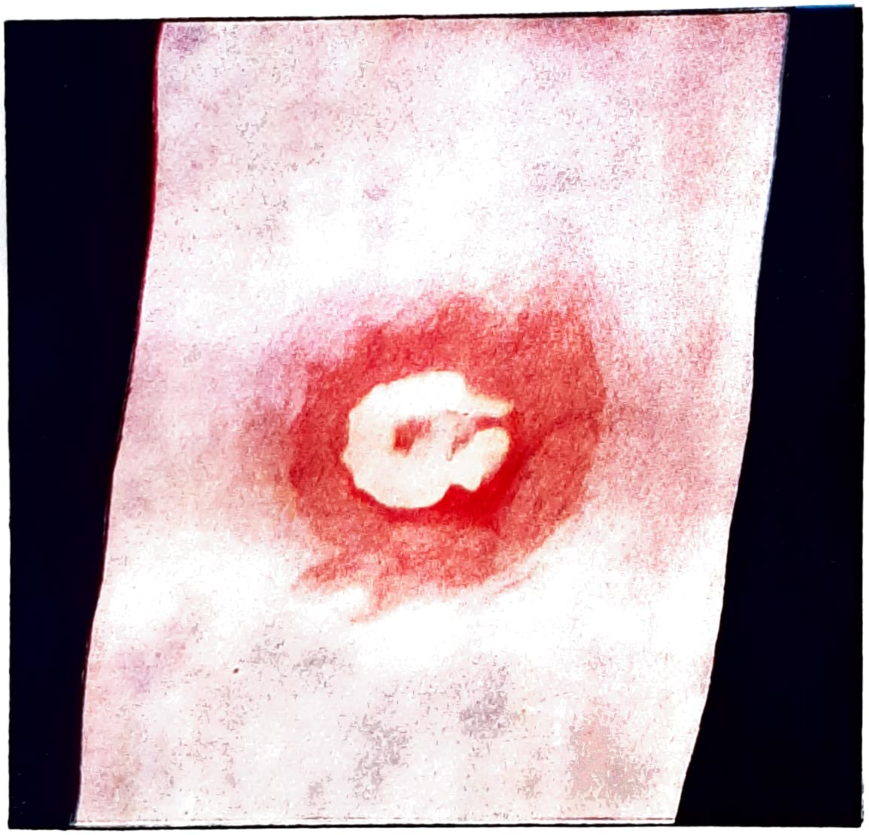


Fig. 322. — Intradermoreacţie la tuberculină intens pozitivă după 24 de ore de la injectarea a 0,1 ml din diluţia 1/1 000 tuberculină.

O altă parte a produsului omogenizat se păstrează pentru ultima şi cea mai sensibilă dintre metodele biologice.

Inocularea la cobai se bazează pe sensibilitatea mare a acestui animal pentru bacilul tuberculos. Datorită sensibilităţii şi specificităţii ei, metoda este capabilă să deceleze cu fineţe cazurile limită de infecţie tuberculoasă, ca infiltratele recente, primoinfecţiile, tuberculoza renală incipientă etc. Metoda poate fi folosită şi ca test de vindecare bacteriologică în tuberculoza tratată.

Calea de elecţie, pentru inoculare, este cea subcutanată, mai rar cea intraperitoneală sau intraganglionară. Tehnica inoculării constă în următoarele: un ajutor ţine cobaiul cu mîna stîngă de subsuori, iar cu dreapta, laba posterioară dreaptă. Se epilează şi se dezinfectează cu tinctură de iod faţa internă a coapsei stîngi. Cu o seringă de 5 ml sterilizată se injectează, sub pielea acestei regiuni, 1 — 2 ml din suspensia de cercetat, după care locul injecţiei este din nou dezinfectat cu tinctură de iod. Se recomandă să se inoculeze, din aceeaşi suspensie, 2 cobai masculi, sănătoşi, tuberculino-negativi, de circa 350 — 400 g fiecare. Prin folosirea a două animale se măresc şansele de pozitivitate, deoarece uneori, cînd inoculăm produse paucibacilare, se poate întîmpla să se tuberculizeze numai 1 cobai din 2. Astfel rămîne posibil un diagnostic, chiar în cazul cînd unul din animale moare mai înainte de a fi prezentat semne de tuberculizare, printr-o afecţiune intercurentă. Dacă produsul de injectat conţine floră de asociaţie, care ar provoca abcese şi eventual septicemii mortale pentru animal, se recomandă ca acesta să fie inoculat o dată cu un antibiotic, de preferinţă cu aureomicină. Penicilina este toxică pentru cobai, iar infecţiile intercurente devin din ce în ce mai penicilinorezistente, astfel încît acest antibiotic nu este de recomandat. Pulberea de aureomicină, 0,10 g per inocul se amestecă în prealabil cu produsul de injectat, se lasă în contact o jumătate de oră, apoi se injectează. Animalele se pun în borcane de sticlă acoperite cu capac de tablă cu sită metalică sau în cuşti individuale speciale, uşor de dezinfectat. Ele vor fi hrănite în primele 24 de ore cu sfeclă proaspătă, pe care s-a pudrat în prealabil praf de sulfamidă. Apariţia eventuală a unui abces precoce la locul de injecţie se tratează local, de asemenea, cu sulfamidă. Fiecare borcan sau cuşcă va purta eticheta cu identitatea animalului respectiv, care are notat: data, numele bolnavului, natura produsului, numărul din registrul de evidenţă. Animalele vor fi observate zilnic, notîndu-se orice modificare. Dacă produsul

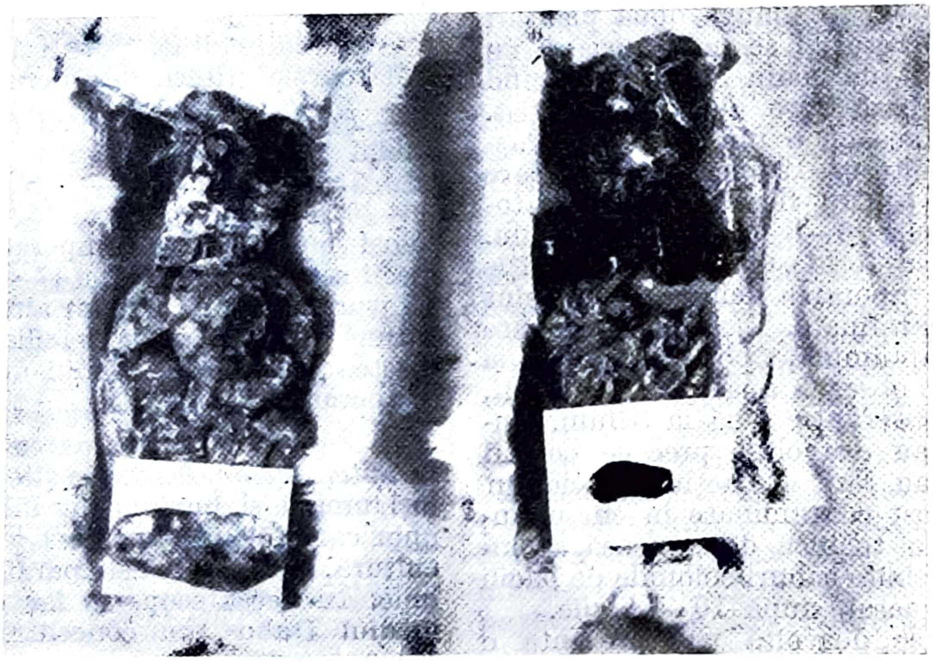


Fig. 321. — Cobai cu leziuni de tuberculoză generalizată (stînga) faţă de cobai normal (dreapta).

injectat a fost foarte bacilifer, se observă încă de la sfîrşitul primei săptămîni după inoculare cum regiunea se împăstează şi începînd cu săptămîna a doua, începe să devină fluctuentă, iar la nivelul plicii inghinale se simte, la palpare, un mic ganglion dur, mobil, rulînd sub deget. Această adenopatie inghinală nu trebuie confundată cu cea inflamatoare, datorită vreunei inflamaţii cu germeni de infecţie secundară, care este mult mai precoce, rău delimitată, fluctuentă şi supurată. Nodulul evoluează, creşte, se ramoleşte şi abcedează sub forma unei ulceraţii. Este şancrul de inoculare, care persistă pînă la moartea animalului. Totodată reacţia la tuberculină se pozitivează; animalul răspunde cu o reacţie pozitivă netă de aspect infiltrativ şi papulo-necrotic la injecţia intradermică a 0,1 ml dintr-o diluţie 1 : 10 de tuberculină. Pozitivarea acestei reacţii constituie unul din semnele precoce cele mai importante de tuberculoză la cobai. Rezultatul se citeşte pe pielea epilată a animalului, abdomen sau flanc, la 24 şi 48 de ore după injectare. Prin precocitatea ei, ea poate, în multe cazuri, preciza diagnosticul într-un timp mai scurt decît oricare altă metodă biologică de precizie. În zilele care urmează animalul slăbeşte progresiv, pe măsură ce infecţia se diseminează, ceea ce face necesar controlul ponderal săptămînal al animalului. Pe lîngă hipertrofiile ganglionare, splina şi ficatul se măresc de volum şi prezintă, la suprafaţa lor, tuberculi miliari şi plaje cazeoase caracteristice la autopsie; se notează cu grijă toate aceste alterări şi se fac frotiuri din puroiul ganglionar şi secţiuni la parafină din splină, care se colorează cu Ziehl. Uneori se găsesc tuberculi şi în plămîni; prinderea acestora este însă tardivă. În nici un caz, prinderea precoce şi masivă a plămînilor la cobaiul inoculat la nivelul coapsei, fără leziuni în ficat şi splină, nu poate fi interpretată ca o tuberculoză experimentală de inoculare, ci este mai probabil rezultatul unei contaminări fortuite pe cale aerogenă, ulterioară inoculărilor de la o sursă infectantă din preajma animalului.

Tuberculoza spontană a cobaiului este extrem de rară şi se poate considera ca fără importanţă practică. În mod obişnuit, infecţia tuberculoasă experimentală duce la moartea animalului în 6 — 8 săptămîni. Dacă produsul a fost foarte sărac în bacili, infecţia experimentală poate avea o evoluţie mult mai lungă, pînă la 6 luni. La autopsie leziunile sînt discrete şi necesită adesea, pentru diagnostic, o reinoculare, la un animal nou, a unor fragmente din splină, ficat şi ganglioni.

Tuberculoza cobaiului se poate confunda cu pseudotuberculoza pe care o dă la acest animal un bacil gram-negativ, imobil, cu coloraţie bipolară, care se dezvoltă uşor pe mediile uzuale. Prezenţa unei hipertrofii ganglionare inghinale satelite, cu ganglioni ramoliţi (cazeificaţi) şi cu prezenţa de bacili acidoalcoolorezistenţi în frotiurile din cazeum colorate cu Ziehl, este însă suficientă pentru a pune diagnosticul de tuberculoză. Dacă un cobai infectat cu tuberculoză este reinoculat cu bacili, se constată apariţia rapidă a unei reacţii inflamatoare locale, fără prinderea ganglionilor. Ţesutul se necrozează şi apoi se vindecă. Acesta este fenomenul Koch, care arată că un animal, o dată infectat cu tuberculoză, prezintă o stare de imunitate particulară, denumită premuniţie sau imunitate de infecţie, care se manifestă prin eliminarea rapidă a bacililor de reinfecţie. Tipul bovin, spre deosebire de cel uman, este foarte virulent pentru iepure, căruia îi provoacă o tuberculoză generalizată, cu leziuni elective la nivelul plămînului, ceea ce permite o diferenţiere între tipul uman şi cel bovin. Examenul bacteriologic al sputei prezintă greutăţi la copii, care nu expectorează, şi la indivizii adulţi care nu elimină sputa. La aceştia, deoarece înghit sputa, se caută bacilul Koch în lichidul de spălătură gastrică. Se face bolnavului un tubaj gastric, introducîndu-i în stomac, pe nemîncate, o sondă gastrică, sterilă prevăzută la capătul liber cu o pîlnie de sticlă. Ţinînd pîlnia la nivelul gurii bolnavului, i se introduce repede, prin sondă, conţinutul unui pahar cu apă călduţă şi bicarbonatată 2%. Se lasă apoi în jos capătul cu pîlnia, pentru a realiza un sifon, şi se recomandă bolnavului să facă în acel moment un efort de vomitare. Lichidul care vine prin sondă este cules într-un pahar mare sau într-un vas steril. Se extrage sonda şi se recomandă bolnavului să tuşească, spre a expulza şi eventualele mucozităţi, împreună cu restul de spută. Lichidul de spălătură este transvazat într-un pahar Berzelius steril, acoperit cu o placă Petri, şi lăsat să sedimenteze pînă a doua zi; pentru un rezultat rapid, se poate şi centrifuga. Se îndepărtează lichidul supernatant şi se face examenul bacteriologic complet al sedimentului prin frotiu direct, omogenizare, flotaţie, însămînţare şi inoculare, după procedeele indicate. Dacă bolnavul nu poate „înghiţi'' sonda, se recomandă să i se anestezieze regiunea faringiană cu o soluţie de cocaină de 1 — 2%.

Căutarea bacilului Koch în spălăturile gastrice tinde să înlocuiască din ce în ce mai mult examenul fecalelor.

Examenul lichidului cefalorahidian în cazurile suspecte de localizare meningiană se face în complex, bacteriologic, citologic şi biochimic.

Se extrag aseptic, prin puncţie lombară sau suboccipitală, 10 ml lichid cefalorahidian în 2 tuburi de centrifugă sterile. Se centrifughează o jumătate de oră la turaţie mare (5 000 turaţii/min), se îndepărtează lichidul supernatant complet dintr-un tub şi se lasă 5 ml lichid supernatant limpede în celălalt. Din depozitul primului tub se fac 3 frotiuri (unul se va colora cu Gram pentru flora banală, altul cu Giemsa pentru citologie, iar al treilea cu Ziehl-Neelsen, pentru bacili acidorezistenţi). Depozitul celui de-al doilea tub se suspendă prin pipetare cu o pipetă Pasteur în lichidul cefalorahidian supernatant şi se însămînţează pe 8 — 10 tuburi cu mediu Loewenstein, cîte X — XII picături de fiecare tub şi 5 — 6 tuburi cu geloză înclinată 2%, pentru eventuala floră de asociaţie. Restul de lichid cefalorahidian se injectează subcutanat, cîte 1 ml, la 2 cobai. Cercetarea lichidului cefalorahidian este importantă în cursul tratamentului cu streptomicină, în cursul căruia frecvenţa bacililor Koch în lichid scade rapid: se impune, deci, să se efectueze, atît cultura, cît şi inocularea la animal. Pentru cultură trebuie ca după centrifugare depozitul să fie resuspendat într-o mică cantitate de soluţie clorurosodică 8,5‰, sterilă, şi nu chiar în lichidul cefalorahidian, spre a se elimina cît mai mult posibil antibioticul. Totodată trebuie să ţinem seama că administrarea de streptomicină provoacă adesea o reacţie cu polinucleare, care nu trebuie confundată cu o infecţie secundară.

Examenul urinii pentru bacili Koch. Tuberculoza renală se traduce bacteriologic prin eliminarea de bacili Koch prin urină. Prezenţa bacililor în urina pielică înseamnă totdeauna existenţa de leziuni bacilare în parenchimul renal. Dacă însă aceste leziuni sînt localizate în regiunea corticală a rinichiului şi nu comunică cu căile de excreţie, urinile nu conţin bacili; din momentul în care leziunea parenchimatoasă capătă acces într-un tub urinifer, baciluria devine pozitivă aproape în toate cazurile.

Prelevarea urinii diferă, după cum este recoltată de la bărbat sau de la femeie. La femeie se face în prealabil toaleta organelor genitale externe, dezinfectînd cu permanganat de potasiu regiunea vulvară. Se reperează orificiul uretral şi se introduce în vezică o sondă sterilă metalică sau de cauciuc. Se recoltează 100 — 200 ml urină, într-un recipient steril. Pentru precizarea sediului leziunilor de tuberculoză renală se recoltează urina prin cateterism ureteral. Dacă urina este clară, se centrifughează într-un tub de centrifugă, eventual după adăugarea prealabilă a 5 ml alcool 50%, pentru modificarea densităţii, timp de cel puţin o oră, la 1 000 turaţii/ /min. Se îndepărtează lichidul supernatant, iar din depozitul obţinut se fac frotiuri, care se colorează cu metoda Gram pentru flora banală şi cu Ziehl-Nielsen. Dacă urina este purulentă (aspect tulbure), se lasă să sedimenteze cîteva ore, se îndepărtează supernatantul şi se examinează preparaţiile din sediment. Examenul direct al sedimentului nu poate da o indicaţie, dacă este vorba de o tuberculoză renală sau de o altă infecţie a căilor urinare. Pentru siguranţă, acesta necesită mai totdeauna completarea cu o însămînţare pe medii şi cu o inoculare la cobai. Pentru însămînţare, dacă urina nu cuprinde floră de asociaţie, se însămînţează 6 — 12 picături pentru un tub Loewenstein, cam 6 — 8 tuburi, sau cu o suspensie în soluţie clorurosodică 8,5‰, sterilă din depozitul de centrifugare. Dacă este infectată, depozitul se tratează în prealabil 15 minute cu acid sulfuric 15%, apoi este spălat în chiar tubul de centrifugă de 3 ori cu soluţia clorurosodică 8,5‰, sterilă şi resuspendat final în 4 — 5 ml soluţie clorurosodică 8,5‰, sterilă. Din această suspensie se însămînţează 6 — 8 tuburi cu Loewenstein, cu cîte 6 — 12 picături de fiecare tub. Inocularea la cobai se face injectînd subcutanat la 2 cobai, cîte 2 ml urină, dacă aceasta este clară şi lipsită de floră de asociaţie sau cuprinde foarte puţină, dat fiind faptul că pe această cale cobaiul tolerează injectarea unui produs uşor contaminat.

Pentru urinile tulburi, se injectează aceeaşi cantitate din depozitul tratat în prealabil cu acid şi suspendat în soluţie clorurosodică 8,5‰, după indicaţiile de mai sus. Tratarea depozitului în vederea însămînţării sau inoculării se mai poate face şi cu hidrat de sodiu 4%, agitare, incubare 1 oră la 37°, centrifugare timp de 15 minute şi neutralizarea depozitului final cu HCl 4%. Pentru examenele de urină, însămînţarea pe medii şi inocularea la animal prezintă o deosebită importanţă, întrucît în aparatul genitourinar există numeroşi bacili acidorezistenţi saprofiţi, imposibil de deosebit, prin examenul direct, de cei patogeni.

Examenul lichidelor din tuberculoza seroaselor, ca lichid de ascită, hidartroze sau revărsări pleurale se face pe baza aceloraşi principii generale : recoltare prin puncţie aseptică, centrifugare, examen direct, însămînţări şi inoculări la animal, după prealabilă tratare, pentru a debarasa produsul de flora neacidorezistentă.

TABELUL 114

Principalele caractere diferenţiale ale bacililor tuberculoşi

Tipul	Aspectul microscopic	Caractere de cultură	Patogenitate
Uman	Forme lungi, subţiri, egale	Creştere eugonică pe medii glicerinate, colonii uscate în 2—3 săptămîni, fără pigment ; temperatura optimă 37°	În cantitate potrivită omoară cobaiul, nu omoară iepurele ; leziuni în splină şi ficat
Bovin	Forme scurte, groase, inegale	Creştere disgonică pe mediile glicerinate. Colonii uscate, în 2—3 săptămîni, fără pigment ; temperatura optimă 37°	Patogen pentru cobai, iepure şi vite ; leziuni predominant pulmonare la iepure
Aviar	Ca la tipul uman	Culturi umede abundente. Temperatura optimă 40°. Coloniile apar în 14 zile, fără pigment	Patogen pentru păsări ; la iepure dă o tuberculoză tip Yersin (septicemică)
Bacili paratuberculoşi	Ca la tipul uman	Culturi abundente după 1—4 zile. Creştere între 10 şi 55°. Pigmentaţie variată	Nepatogeni pentru animale cu sînge cald

Reacţii biologice de diagnostic

Organismul infectat cu tuberculoză prezintă o stare alergică specifică, alergia tuberculinică, care se pune în evidenţă cu ajutorul tuberculinei. Tuberculina este un produs de metabolism al bacilului Koch, care se obţine prin cultivarea microbului în bulion glicerinat. Cultura se filtrează şi apoi se reduce la 1/10 din volumul ei, prin evaporare. Aceasta reprezintă tuberculina veche a lui Koch sau *Alttuberkulin.* Prin precipitare cu acid tricloracetic se obţine un derivat proteic purificat, „PPD", de 500 de ori mai activ. Testele cu tuberculină cele mai utilizate sînt :

a) *Cutireacţia Pirquet.* Se depune pe pielea aseptizată o picătură de tuberculină brută, prin care pielea este scarificată cu un scarificator special sau cu o lanţetă, evitîndu-se apariţia sîngelui. Apariţia după 48 de ore a unei papule eritematoase cu diametrul de peste 0,5 cm indică o reacţie pozitivă. Reacţia este mai puţin sensibilă decît intradermoreacţia.

b) *Intradermoreacţia Mantoux.* Se injectează intradermic, pe faţa anterioară a antebraţului 0,1 ml tuberculină diluată 1/10 000. Reacţia pozitivă se traduce prin apariţia unei infiltraţii nodulare, înconjurată de o zonă de eritem de cel puţin 10 mm diametru. Citirea se face după 24 şi 48 de ore. Interpretarea reacţiei : reacţia pozitivă este mărturia unei infecţii cu bacili Koch, fără a fi vorba însă totdeauna de o tuberculoză-boală, evolutivă. La adulţi reacţia este pozitivă în proporţie de 50 — 80% din cazuri. Reacţia negativă denotă o stare de anergie şi poate fi interpretată astfel :

— lipsa alergiei tuberculoase = anergie primitivă la indivizi neinfectaţi ;

— prezenţa unei infecţii în stadiul prealergic sau în cazuri grave, preterminale, la organisme areactive ;

— stare de anergie produsă de boli infecţioase anergizante : rujeolă, gripă, tuse convulsivă, febră tifoidă sau după tratamente îndelungate cu tuberculostatice şi în special cu hidrazidă.

Alergia postvaccinală

Reuşita vaccinării se poate aprecia prin pozitivarea reacţiei la tuberculină. Durata instalării alergiei este variabilă. Reacţia la tuberculină devine pozitivă la 4 — 6 săptămîni, uneori însă abia după 3 — 4 luni.

Cercetarea alergiei postvaccinale se face începînd din a șasea săptămînă, prin intradermoreacția la tuberculină 1/10 000; la cei cu reacții tuberculinice dubioase se va repeta controlul după o săptămînă, cu tuberculină 1/1 000.

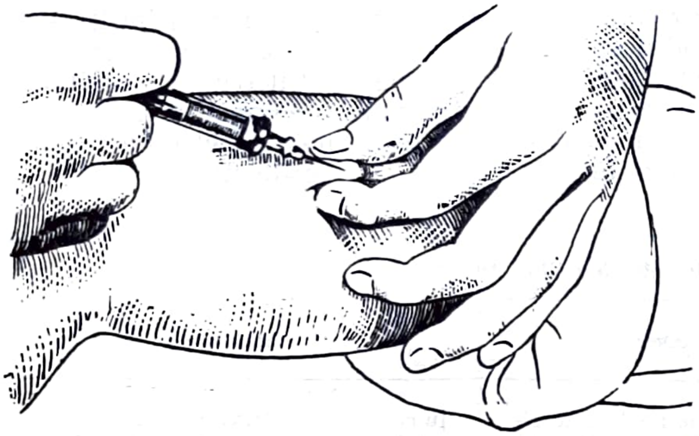


***Fig. 323.* — Tehnica injectării intradermice. Se vede papula dermică determinată de introducerea corectă a lichidului. Lipsa apariției papulei indică o tehnică eronată, lichidul a pătruns în țesutul celular subcutanat.**

Se recomandă ca în perioada de instalare a alergiei, perioada prealergică de 4 — 6 săptămîni, copilul vaccinat să nu fie supus altor eforturi biologice (vaccinări, intervenții chirurgicale) și să fie ferit, pe cît posibil, de eventuale contaminări tuberculoase. Cercetările tot mai numeroase din ultimii ani, privind chimioprofilaxia tuberculozei, aduc date din ce în ce mai convingătoare asupra posibilităților de realizare a unei chimioprofilaxii științifice în tuberculoză, prin folosirea tuberculostaticului de mare eficacitate care este hidrazida.

Este posibil ca în viitorul apropiat, prin asocierea profilaxiei specifice cu chimioprofilaxia, să se constituie premisele eradicării tuberculozei.

Testarea sensibilității bacilului Koch la antibiotice și chimioterapice

Tratamentul modern al tuberculozei se face azi în special cu streptomicină, acid paraaminosalicilic (PAS) și mai ales cu hidrazida acidului izonicotinic (H.I.N.), așa că se poate testa sensibilitatea microbului izolat față de aceste substanțe medicamentoase și se poate stabili concentrația în umorile organismului a substanțelor antituberculoase după administrarea dozelor terapeutice.

În practică, datorită apariției frecvente a fenomenului de rezistență, se folosesc mai mult metodele care urmăresc să stabilească gradul de rezistență a tulpinii de bacil Koch, pentru a putea administra dozele terapeutice corespunzătoare. Se utilizează, în acest scop, 2 metode:

— metoda indirectă, care necesită izolarea prealabilă a bacilului din organismul bolnav;

— metoda directă care se aplică direct produsului patologic.

Metoda rapidă Jensen se aplică produselor patologice bogat bacilifere, sub forma microculturilor pe lamă. În cazul produselor sărace în bacili este necesară izolarea prealabilă a bacililor și deci, folosirea unei metode lente.

Tehnica. Se prepară 28 de lame înguste, tăind de-a lungul lame de microscopie obișnuite. Se prepară 28 de tuburi, cu cîte 6 ml mediu Youmans cu adaos de ser de bou sau plasmă umană, sau mediul Šula cu ascită. Într-o serie de 6 tuburi cu mediul de cultură se adaugă cantități variabile de streptomicină (0,1, 1, 2, 5, 10 și 100 γ/ml), într-o a doua serie se fac diluții de H.I.N. (0,02; 0,05; 0,07; 0,1; 0,5; 1 γ/ml), în a treia serie de tuburi se fac diluții de PAS (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1 γ/ml), iar în a patra serie de tuburi se fac diluții de tebezonă (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1 γ/ml). La fiecare serie se adaugă un tub cu mediu, martorul fără antibiotic. Produsul patologic de cultivat, de obicei sputa, se întinde sub formă de frotiu în strat subțire și uniform pe cele 28 de lame. Se lasă să se usuce bine la temperatura camerei. Apoi se ia fiecare lamă pe rînd și se așează cu grijă într-un pahar cu acid sulfuric 6 %, fără a agita, pentru a nu desprinde frotiurile. Se lasă ca acidul sulfuric să acționeze 6 minute, pentru a distruge flora de asociație, neacidorezistentă, din produsul patologic. Apoi se varsă acidul și se înlocuiește de 2 ori cu apă distilată sterilă, pentru a spăla acidul de pe preparate. Lamele astfel spălate se introduc cu o pensă sterilă în fiecare din cele 4 serii de tuburi de cultură. După 7 — 10 zile la 37° se face un control prin colorare Ziehl-Neelsen a unei lame dintr-un tub martor. Dacă la examenul microscopic cu obiectivul 3 se observă colonii sub forma de mustăți bine dezvoltate, se vor scoate lamele din toate tuburile și se vor examina. Dacă creșterea la martor nu este suficientă, se mai lasă la termostat 5 — 6 zile, după care se face un nou control la martor. Interpretarea rezultatelor se face prin compararea culturilor martor cu acelea care conțin diluțiile de tuberculostatice.

Metoda Galland. Pentru însămînțarea directă a produsului bacilifer se folosește mediul Löwenstein-Jensen în tuburi de 16/160 mm, iar diluțiile de antibiotic se adaugă pe suprafața mediului. Metoda are avantajul că realizează izolarea și testarea sensibilității simultan. Mediul de cultură folosit trebuie să fie proaspăt preparat, pentru a-și păstra sensibilitatea de creștere pentru bacilul Koch. Pentru streptomicină și PAS se folosesc serii de 5 tuburi, din care 2 sînt martori fără antibiotic. Pentru hidrazidă se folosesc 6 tuburi. Prepararea mediilor impregnate cu substanțele bacteriostatice se realizează introducînd cu o pipetă sterilă, în lichidul de condensare al fiecărui tub, 0,25 ml din diluțiile pregătite, ca în tabelul de mai jos:

Diluții de tuberculostatic în apă distilată sterilă exprimate în γ/ml. Se va introduce 0,25 ml în fiecare tub de mediu

Streptomicină	2 tuburi martori cultură fără tuberculostatic	
	tub I	100 γ/ml
	tub II	500 γ/ml
	tub III	2500 γ/ml
PAS	2 tuburi martori cultură fără tuberculostatic	
	tub I	25 γ/ml
	tub II	125 γ/ml
	tub III	500 γ/ml
H.I.N.	2 tuburi martori cultură fără tuberculostatic	
	tub I	5 γ/ml
	tub II	50 γ/ml
	tub III	250 γ/ml
	tub IV	1000 γ/ml

Prin înclinarea fiecărui tub, soluțiile de tuberculostatic sînt răspîndite uniform pe toată suprafața mediului de cultură, apoi se așează tuburile în poziție orizontală la 37°, pînă cînd lichidul este complet evaporat și tuberculosticul bine difuzat în mediu. Însămînțarea produsului patologic se face după tratare prealabilă pentru distrugerea florei neacidorezistente, introducînd în fiecare tub 8 picături de inocul. Inoculul este răspîndit uniform pe suprafața mediului, prin înclinarea tuburilor. Tuburile sînt apoi parafinate sau, preferabil, închise etanș cu leucoplast sau capușonate și menținute într-o înclinație convenabilă la termostat, pînă la citirea rezultatelor.

Citirea și interpretarea rezultatelor. Citirea se efectuează la 3 săptămîni, după ce ne-am convins că la tuburile martor coloniile s-au dezvoltat satisfăcător și în număr suficient. Este necesar, de asemenea, să verificăm dacă numărul coloniilor dezvoltate în tuburile martori este sensibil egal și astfel ne dăm seama de uniformitatea răspîndirii inoculului și de omogenitate, pentru a evita eventuale interpretări eronate.

Reproducem mai jos, după Galland, cele 3 posibilități de interpretare a testului:

	Bacili sensibili	Bacili la limita sensibilității	Bacili rezistenți la dozele uzuale	Bacili cu rezistența crescută
Streptomicină	Nici o colonie în tubul I	Cîteva colonii în tubul I	Prezența coloniilor în tubul II	Prezența coloniilor în tubul III
PAS.	Nici o colonie în tubul I	Cîteva colonii în tubul I	Prezența coloniilor în tubul II	Prezența coloniilor în tubul III
H.I.N.	0—3 colonii în tubul I	Cîteva colonii în tubul II	Prezența coloniilor în tubul III	Prezența coloniilor în tubul IV

A. *Cînd numărul coloniilor la tuburile martor depășește 50 pe tub*

Dacă numărul coloniilor care apar în tuburile-test, în comparație cu tuburile martor este într-o proporție de 1/3, putem trage concluzia că este vorba de o rezistență parțială a tulpinii de *Mycobacterium tuberculosis* izolate de noi.

Dacă numărul coloniilor este apropiat de cel observat la tuburile martor, este vorba de o rezistență totală a tulpinii față de antibioticul sau chimioterapicul considerat.

B. *Cînd numărul coloniilor la tuburile martor este între 10 — 50 pe tub*

În aceste condiții, apariția coloniilor în tuburile II la streptomicină și PAS și în tubul III la H.I.N. denotă rezistența tulpinii izolate. Aprecierea dacă rezistența este parțială sau totală nu mai poate fi făcută în această situație, din cauza numărului limitat de colonii din tuburile martor.

C. *Cînd numărul coloniilor la tuburile martor este sub 10 pe tub*

Dacă apar colonii în tuburile II la streptomicină și PAS și în tubul III la H.I.N., tulpina poate fi considerată ca rezistentă. Se poate admite o oarecare sensibilitate numai dacă nu apare nici o colonie în tuburile care conţin substanţele bacteriostatice.

În cazurile B şi C, metoda de testare a sensibilităţii are o valoare relativă de orientare, datorită creşterii slabe, care nu permite o apreciere statistică comparativă a rezultatelor.

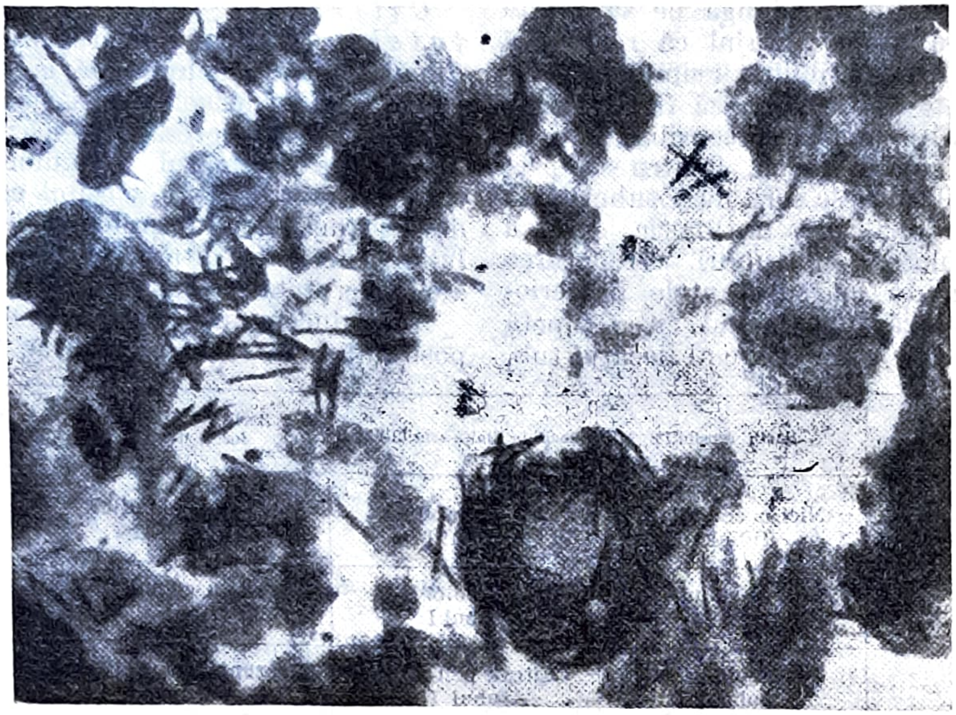


Fig. 324. — *Mycobacterium leprae.* Frotiu din secreţie nazală. Se văd numeroşi bacili extracelulari şi intracelulari alcătuind „globi" leproşi.

Trebuie să atragem, de asemenea, atenţia asupra importanţei omogenităţii inoculului. Creşterea neregulată a coloniilor, datorită unui inocul neomogen sau infectarea secundară a tuburilor, datorită unei tehnici defectuoase de însămînţare, fac metoda inutilizabilă.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LEPREI

Generalităţi

Lepra este o boală infecţioasă transmisibilă, specifică omului, al cărei agent etiologic este *Mycobacterium leprae.*

O dată cu descoperirea tehnicii de coloraţie pentru bacteriile acidorezistente de către Ehrlich şi aplicată la bacilul tuberculozei de către Ziehl şi Neelsen, a fost uşor de demonstrat caracterul acidorezistent al bacilului leprei şi asemănarea lui morfologică cu bacilul tuberculozei.

Bacilii leprei se găsesc în ţesuturile lezate, predominant în citoplasma celulelor mononucleare sau epitelioide, aşa-zisele „celule leproase". În interiorul acestora se formează conglomerate de bacili aşezaţi caracteristic, asemănător pachetelor de ţigări, care tind să împingă nucleul la periferia celulei şi care au fost denumite „globi leproşi". Bacilii sînt de obicei drepţi sau uşor încurbaţi, cu capetele ascuţite sau rotunjite, de dimensiuni variabile, între 1 şi 7 μ lungime pe 0,2 — 0,45 μ diametru, se pot colora cu fucsina Ziehl uniform în roşu sau cu aspect granular. *Mycobacterium leprae* este imobil, nesporulat, necapsulat, acidorezistent şi spre deosebire de bacilul tuberculozei se colorează bine cu coloraţia Gram, fiind grampozitiv. Biologie şi cultivare: bacilul leprei ocupă un loc unic în lumea microorganismelor patogene. El este exclusiv patogen pentru om şi a reuşit, în cea mai mare măsură, dintre toate bacteriile patogene cunoscute, să se adapteze la o stare de parazitism simbiotic deosebit de bine echilibrat, în celulele ţesutului pe care le parazitează. *Mycobacterium leprae* poate persista în cantităţi apreciabile în contact intim cu ţesuturile organismului, chiar în interiorul celulei, fără a provoca din partea acesteia decît o reacţie slabă sau neînsemnată. Pentru a deveni capabil să realizeze această adaptare deosebită pentru organismul gazdei, bacilul pare să fi pierdut, aparent, orice capacitate de a supravieţui şi a se înmulţi în afara organismului, chiar şi în culturile de ţesuturi de provenienţă umană, ceea ce denotă un grad deosebit de perfecţionat de parazitism.

Nenumăraţi cercetători au încercat izolarea din leziuni şi cultivarea bacililor leprei. Deşi au fost izolaţi diferiţi microbi acidorezistenţi, cu proprietăţi morfologice şi tinctoriale asemănătoare cu acelea ale bacilului Hansen, nu s-a putut aduce nici o dovadă experimentală că aceştia sînt adevăraţii bacili ai leprei. Încercările de a reproduce lepra experimental, la animale, au dat rezultate încă neconvingătoare pînă în prezent.

Forme clinice şi localizarea leziunilor

Lepra este o infecţie granulomatoasă, care evoluează sub 3 forme clinice principale : *forma nodulară* sau *lepromatoasă*, care se caracterizează prin apariţia nodulilor granulomatoşi, „leproame'', în ţesutul cutanat, în mucoase şi în variate viscere (plămîn, ficat, splină, testicul etc.). *Forma maculoanestezică* rezultînd din organizarea infiltratului granulomatos pe traseul unor anumiţi nervi şi terminaţii nervoase, cu paralizii de tip motor şi senzitiv, care determină apariţia tulburărilor trofice caracteristice ale pielii : „pete pigmentate cu zonă de anestezie''.

Există şi a treia formă clinică, *mixtă*, în care se întîlnesc ambele tipuri de leziuni.

Bacilii leprei se întîlnesc în leziunile granulomatoase şi sînt deosebit de numeroşi în forma nodulară sau lepromatoasă. În majoritatea lor, bacilii Hansen sînt aşezaţi paralel, în pachete, intracelular (globi). Pot fi însă întîlniţi în afara celulelor, în pereţii vaselor mici, în glandele pielii, în ganglionii limfatici şi în special în secreţiile mucoasei nazo-faringiene şi bucale, pentru că leziunile mucoaselor se ulcerează uşor, punînd în libertate bacilii în cantităţi mari.

Bacilii sînt rar întîlniţi în macule, pentru că acestea sînt leziuni secundare trofice şi nu leziuni primare de lepră. În infiltratele granulomatoase de pe traiectul nervilor se găsesc, de asemenea, bacilii Hansen, dar mai puţin numeroşi decît în leziunile nodulare.

Există însă şi posibilitatea de a găsi bacilii leprei în ţesuturi şi organe lipsite de leziuni de lepră.

Diagnosticul bacteriologic

Datorită progresului imens realizat, după cel de-al doilea război mondial, în tratamentul leprei cu derivaţii sulfonici, lepra a devenit o boală curabilă, cu condiţia diagnosticării ei cît mai precoce. O dată leziunile de tip distructiv instalate, tratamentul nu mai poate să aducă decît ameliorări. Prin prisma acestor constatări, diagnosticul bacteriologic precoce, în lipsa simptomelor clinice caracteristice în fazele incipiente ale bolii, îmbracă o importanţă deosebită.

Diagnosticul bacteriologic al leprei se bazează pe punerea în evidenţă a bacililor în produsul patologic, care poate fi secreţie nazală, spută sau exsudat dintr-un nodul lepromatos ; se fac frotiuri direct din exsudat dacă nodulul este ulcerat, sau după puncţionare prealabilă cu un ac gros, în caz că nodulul nu este ulcerat. După fixare şi colorare cu Ziehl-Neelsen, se examinează cu imersie ; bacilii Hansen se prezintă sub formă de bacili acidorezistenţi, aşezaţi paralel „în pachete de ţigări'', extracelular şi mai ales intracelular (globi leproşi). În acest sens, se menţionează faptul că frotiurile trebuie să fie întinse cu grijă, pentru a avea celule intacte în preparat.

O altă metodă de recoltare a produsului patologic, larg folosită azi, este excizia unei porţiuni din ţesutul cutanat de la nivelul lepromului, cu dimensiunile de 3 mm lungime şi 2 mm grosime, cu ajutorul unei foarfeci încurbate, fine.

Corionul dermului din fragmentul recoltat este imprimat sub forma de 2 — 3 amprente pe o lamă de microscopie care, după fixare, este colorată cu Ziehl-Neelsen.

Fragmentul de ţesut excizat mai poate fi incluzionat în parafină şi secţionat la microtom, apoi colorat. Dacă prin aceste metode nu am decelat bacilii Hansen intracelulari, recoltăm secreţie nazală, dar mai bine raclăm superficial, cu un bisturiu, mucoasa nazală şi facem frotiuri prin amprentă, pentru a obţine cît mai multe celule intacte.

Prezenţa bacililor acidorezistenţi, aşezaţi caracteristic şi în special în număr mare, situaţi intracelular, este suficientă pentru diagnosticul de lepră.

Dacă plămînii sînt sediul leziunilor leproase, bacilii Hansen pot fi găsiţi în spută. În această situaţie ei trebuie diferenţiaţi de bacilii tuberculoşi, prin inoculare la animal; bacilii leprei nu produc nici un efect patologic la animalele de laborator.

La cazurile uşoare sau îndoielnice de lepră, în care diagnosticul este dubios, fie din lipsa bacililor intracelulari, fie datorită numărului redus de bacili, se poate folosi testul cu iod, preconizat de Rogers şi Muir, în 1946. Administrarea de 2 g iodură de potasiu într-un pahar cu apă, înaintea recoltării produselor patologice, produce o congestie şi o exacerbare a leziunilor locale, în special la nivelul mucoaselor, favorizînd apariţia bacililor leproşi în produsul de cercetat. Înainte de a trage concluzia că bolnavul nu are lepră, doza trebuie repetată şi mărită la 6 g iodură de potasiu. Reacţiile serologice, ca fixarea complementului şi altele, s-au dovedit a fi fără importanţă practică pentru diagnosticul leprei.

Testul la lepromină a fost propus de Mitsuda, în 1936, cu speranţa că ar fi tot atît de specific în lepră ca şi testul cu tuberculină în tuberculoză. Antigenul este preparat din noduli leproşi, care conţin mulţi bacili. Nodulii sînt recoltaţi de la bolnavi, de obicei de pe lobul urechii, sînt apoi suspendaţi în soluţie salină 8,5°/₀₀ fierţi timp de 1 oră şi mojaraţi, pînă se obţine un material de consistenţă păstoasă. Se adaugă soluţie salină 8,5°/₀₀, pentru a se obţine o diluţie finală de 1 g ţesut/20 ml lichid. Se lasă să se depună particulele solide; supernatantul opalescent este pipetat şi filtrat prin tifon. Filtratul este autoclavat la 120°, timp de 15 minute, pentru a se asigura sterilitatea, apoi se adaugă 0,5% fenol.

Acest produs denumit lepromină conţine numeroşi bacili leproşi. Păstrată în flacoane de culoare închisă, la rece, lepromina rămîne mult timp activă. Testul cu lepromină se face injectînd 0,1 ml de lepromină intradermic. Nu există o substanţă pentru o injecţie martor. Se observă 2 tipuri de reacţii: reacţia precoce seamănă cu reacţia la tuberculină şi apare după 24 — 48 de ore; reacţia tardivă începe între a şaptea şi a zecea zi ca o papulă mică, care creşte treptat pînă la a 25-a — a 30-a zi, cînd devine un nodul cu un diametru de 1 cm; deseori centrul nodulului se necrozează şi se elimină, lăsînd în urma lui un mic ulcer, care se vindecă după cîteva săptămîni. Mitsuda a observat ambele tipuri de reacţii la cazurile de lepră nodulară şi maculoanestezică, care erau pe cale de vindecare, dar reacţia a fost negativă în cazurile progresive de lepră. El a observat însă teste pozitive şi la indivizi sănătoşi, care nu au avut nici un contact cu leproşi.

Explicarea mecanismului reacţiei este încă îndoielnică. Faptul că indivizi sănătoşi tuberculino-pozitivi reacţionează mai frecvent la reacţia Mitsuda, decît cei care sînt tuberculino-negativi sugerează că poate fi vorba de o stare de alergie cauzată de anumiţi constituenţi comuni ai bacililor acidorezistenţi. În orice caz, reacţia nu este considerată ca o reacţie specifică pentru diagnosticul leprei, deşi i se admite o valoare prognostică.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUBERCULOZEI PULMONARE

Schema A

Produs patologic: sputa sau mucozităţile traheobronşice recoltate prin bronhoscopie

A. *Examenul microscopic*

— Se efectuează 2 frotiuri directe din spută, pe lame curate şi degresate, alegînd cu ansa fragmentele purulente. Se colorează Ziehl-Neelsen şi se examinează la microscop, minimum 10 minute.

— Se efectuează omogenizarea sputei prin metoda flotaţiei şi se fac 2 frotiuri colorate cu Ziehl-Neelsen. Se examinează la microscop pentru a decela bacilii în cazul examenului microscopic direct negativ sau pentru a confirma prezenţa lor în cazul sputelor paucibacilare la examenul direct.

Se eliberează un buletin de analiză, în care se precizează prezenţa la examenul microscopic direct şi după omogenizare a rari sau numeroşi bacili acidoalcoolorezistenţi în sputa examinată.

B. *Insămînţări pe medii de cultură şi inoculare la animal*

— Într-un pahar conic steril de 50 ml se tratează cu acid sulfuric soluţie 15 % o porţiune mucopurulentă din sputa de cercetat. Se amestecă bine acidul cu sputa cu ajutorul unei baghete sterile, timp de 15—20 de minute, pentru distrugerea florei de asociaţie, se adaugă 2 picături de tinctură de turnesol. Cu o pipetă Pasteur sterilă se neutralizează amestecul cu o soluţie de

NaOH 30 % pînă la virajul de culoare al indicatorului de la roşu la albastru ametist. Peste amestecul neutralizat se adaugă 5 ml soluţie clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$ sterilă şi se trece cu o pipetă sterilă într-un tub de centrifugă steril. Se centrifughează 10 minute la 3000 turaţii/min. Se aspiră supernatantul şi se îndepărtează. Sedimentul se suspendă în 5 ml soluţie clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$ sterilă, se însămînţează pe mediile de cultură şi se inoculează la cobai :

Însămînţare pe mediul Loewenstein sau Jensen şi pe geloză înclinată. Însămînţarea se face cu o pipetă Pasteur sterilă, cîte 6 picături în 8 tuburi Loewenstein şi 4 tuburi geloză înclinată.

Tuburile însămînţate sînt astfel înclinate încît inoculul să se răspîndească uniform pe suprafaţa mediului şi să se aşeze în poziţie orizontală la 37°. După evaporarea lichidului de la suprafaţa mediului, sînt închise ermetic cu un tifon parafinat sau cu leucoplast.

Inocularea sub pielea coapsei a cîte 1 ml inocul la 2 cobai de 250 – 300 g sănătoşi, tuberculinonegativi.

- Culturile se incubează astfel : la termostatul de 37°, 6 tuburi Loewenstein şi 2 tuburi geloză înclinată ; la temperatura camerei 22°, 2 tuburi Loewenstein şi 2 tuburi geloză înclinată.
- În prima săptămînă culturile se controlează zilnic, pentru a decela tuburile în care apar colonii precoce şi care se datoresc florei de asociaţie care a rezistat la acţiunea acidului. Coloniile de bacili tuberculoşi apar abia după 10 – 14 zile şi au o morfologie variată, de cele mai multe ori rotunde, rugoase, plate, cu depresiune centrală crateriformă de culoare galbenă – cenuşie. Din coloniile bine individualizate se efectuează frotiuri colorate cu Ziehl-Neelsen, pentru a verifica prezenţa bacililor acido-rezistenţi în cultură.
- Din coloniile identificate prin frotiu ca aparţinînd bacililor acido-alcoolo-rezistenţi se efectuează testarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice şi realizarea infecţiei experimentale pe cobai.
- Cînd în culturi se dezvoltă colonii cu caracterele bacililor paratuberculoşi se folosesc testele de diferenţiere prin comportarea faţă de PAS.
- În cazul cînd sputa examinată a fost bogat baciliferă, simultan cu însămînţarea şi inocularea la animal, se va efectua metoda rapidă de izolare şi testare a sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice prin microculturi pe lamă.
- În cazul sputelor paucibacilare la examen direct, se va folosi metoda Galland de izolare şi testare a sensibilităţii cu grija de a realiza un inocul cît mai omogen.
- Infecţia experimentală la cobaii inoculaţi se urmăreşte săptămînal prin controlul locului de inoculare de la nivelul coapsei. Şancrul de inoculare apare după 8 – 10 zile şi persistă pînă la moartea animalului.
  După 10 zile se poate testa apariţia alergiei tuberculinice prin injectarea intradermică a 0,1 ml dintr-o diluţie 1/10 de tuberculină. Şancrul de inoculare şi pozitivarea reacţiei la tuberculină reprezintă semnele precoce de tuberculoză experimentală la cobai.
  În continuare, se controlează săptămînal greutatea animalelor infectate, care slăbesc progresiv. La 6 săptămîni se sacrifică unul din cele 2 animale şi la autopsie se urmăresc leziunile tipice de tuberculoză experimentală ale cobaiului. Splina şi ficatul sînt hipertrofiate, leziunile macroscopice specifice sînt tuberculii miliari şi leziunile cazeoase în splină, ficat şi plămîni. Pe preparatele histopatologice efectuate din fragmente de ţesut splenic sau hepatic se decelează leziunea microscopică specifică tuberculozei, foliculul tuberculos.

Se eliberează buletinul definitiv de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, de patogenitate şi sensibilitatea la antibiotice şi chimioterapice a tulpinii de *Mycobacterium tuberculosis* izolată.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUBERCULOZEI UROGENITALE

Schema B

Produs patologic : urină emisă spontan sau recoltată prin sondare vezicală sau cateterism uretral.

- Urina clară se centrifughează direct după adăugare prealabilă de 5 ml alcool 50 % la 100 ml urină pentru modificarea densităţii.
- Urina tulbure se lasă să se sedimenteze. Sedimentul este tratat cu acid sulfuric 15 % pentru flora de asociere şi apoi neutralizat şi spălat prin centrifugare cu ser fiziologic steril.
- Se poate efectua din sediment un examen microscopic a 2 frotiuri colorate cu Ziehl-Neelsen. Examenul are însă numai o valoare relativă de orientare, datorită confuziei posibile cu *M. Smegmatis*, saprofit al căilor urogenitale la om.
- Sedimentul de centrifugare suspendat în 5 ml soluţie clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$ sterilă, se însămînţează şi se inoculează astfel :

8 tuburi cu Loewenstein, 4 tuburi geloză înclinată, Incubaţie la 37 şi 22°.

Inoculare cîte 1 ml inocul sub pielea coapsei la 2 cobai de 250 – 300 g tuberculino-negativi sub pielea coapsei.

- Urmărirea culturilor și a animalelor inoculate se efectuează ca la schema A.
- Datorită faptului că adeseori inoculul urinar este extrem de sărac în bacili, însămînțările pot rămîne negative și numai inocularea la cobai rămîne singura metodă de decelare a infecției. Uneori și infecțiile experimentale evoluează foarte încet, de aceea animalele se mențin în observație 6 luni de la inocularea cu sediment urinar.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LEPREI

Schema de diagnostic

Produs patologic: exsudat nazal sau exsudat din leprom cutanat.

- Se efectuează frotiuri din exsudatul nazal spontan sau provocat prin rinita medicamentoasă. Se folosesc lame noi, curate și degresate. Se depune o picătură de exsudat pe lamă și cu ajutorul unei lamele sau unei lame cu colțurile tăiate se întinde frotiul ca un frotiu de sînge, pentru a nu altera celulele din exsudat. Se usucă, se fixează la flacără timp de 2 secunde și se colorează Ziehl-Neelsen. Este bine să se efectueze 4—5 frotiuri colorate pentru a putea decela bacilii chiar cînd sînt rari. Prezența bacililor acido-rezistenți așezați paralel, extracelular și mai ales intracelular (globi leproși), este caracteristică pentru diagnostic.
- Efectuarea frotiurilor prin amprentă din corionul dermului unui leprom cutanat excizat constituie metoda cea mai sigură de diagnostic pentru că există posibilitatea de a decela numeroși globi leproși caracteristici.
- După efectuarea frotiurilor prin amprentă, fragmentul de țesut excizat se poate incluziona la parafină, se fac secțiuni la microtom și se realizează preparate histopatologice care se colorează cu hematoxilină-eozină și cu Ziehl-Neelsen.

Se eliberează buletinul de analiză, în care se arată decelarea bacililor acidorezistenți, intra- și extracelulari, la examenul microscopic direct al frotiurilor din exsudatul nazal și prin amprentă din corionul dermului. Se va indica prezența aspectului caracteristic de pachete de bacili acidorezistenți, fagocitați în citoplasma mononuclearelor (globi leproși).

BIBLIOGRAFIE

BÎLBÎE V., RACOVIȚĂ CL., THOMAS EMILIA, LEONDARI V., DUMITRESCU GABRIELA. — Posibilități, greutăți și perspective în diagnosticul microbiologic al tuberculozei urogenitale, *Microbiologia (București)*, 1962, nr. 1, p. 33—46.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 658—795.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 262—282.

JORSEN NYBOE — The efficacy of the tuberculin test, Bull. O.M.S., 1960, vol. 22, p. 5—38.

KOLMER J., BOERNER F. — Approved laboratory techniques, ed. a 4-a, Ed. Appleton-Century, New-York, 1945, p. 461—467.

MACKIE T. J., MCCARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 397—414.

MIDDLEBROOK G., FREUND J. — Bacterial and mycotic infections of man, ed. a 2-a, Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 324—358.

MODEL L. M. — Biologhia i biochimia tuberculosa mikobacterii, Medghiz, Moscova, 1952.

NASTA M., NEGULESCU VL., ALGEORGE G. — Model experimental pentru aprecierea in vivo a acțiunii preparatelor bacteriostatice antituberculoase, *Cercetări de ftiziologie*, Edit. Med., Buc., 1956, vol. 5, p. 204.

OLIVEIRA DE ALMEIDA JOSÉ — Serological studies on leprosy : a comparison of complement — fixation tests using antigens prepared from tubercle bacili and beef-heart lipids with other serological reactions, Bull. O.M.S. 1962, vol. 26 p. 233—240.

OPRESCU C. C. — Bacteriologie medicală (sub. red. prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, București, 1961 p. 539—576.

OPRESCU C. C. — Stadiul actual al problemei imunității antituberculoase, *Microbiologia (București)*, 1962, nr. 1, p. 1—3.

OPRESCU C. C., IEREMIA T. — Diagnosticul bacteriologic al infecțiilor cu micobacterii la om, *Microbiologia (București)*, 1959, nr. 4, p. 337—356.

OPRESCU C. C. — Asupra prezenței bacililor acidorezistenți în produsele patologice provenite de la indivizi indemni de tuberculoză, *Ftiziologia*, 1955, nr. 1, p. 51—55.

OPRESCU C. C. — Aspecte actuale în studiul infecției bacilare experimentale, *Microbiologia (București)*, 1960, nr. 1, p. 79—88.

OPRESCU C. C. — Infecțiunea cu micobacterii. Ed. Acad. R.P.R., București, 1963.

O.M.S. — Série de rapports techniques, nr. 189, Comité d'experts de la lèpre (deuxième rapport), O.M.S., Genève, 1960, p. 5—9 (Réaction à la lépromine).

RICH A. R. — The pathogenesis of tuberculosis, Ed. Th. Springfield, Illinois, 1951.

RUGE H. G. S., FROMM G., FÜHNER F., GUINTO R. S., — Serological findings in leprosy : an investigation in to the specificity of various serological tests for syphilis, *Bull. O.M.S.*, 1960, vol. 23, nr. 6, p. 793—802.

SCHMIDT, HENNING — Reactivity of a lecithin-free cardiolipin preparation in leprosy sera, *Bull. O.M.S.*, 159, vol. 20, p. 1 175—1192.

STITT E. R., CLOUGH P. W., BRANHAM S. E. — Practical bacteriology, hematology and parasitology, ed. a 10-a, Ed. Blokiston, New-York, 1928, p. 74—89.

THOMPSON R. V. — Microbiology and epidemiology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Londra, 1958, p. 406—422.

TOPLEY and WILSON'S — Principles of bacteriology and immunity, ed. a 4-a, Ed. Edward Arnold, Londra, 1955, vol. I. p. 488—522; p. 525—528.

VEISFEILER C. I. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecțioase, G. J. Sinai și O. G. Birgher, Ed. Științ., București, 1952, p. 460—482.

WATTERS M.F.R. — The infectivity and mode of spread of leprosy. A review. *Med. J. Malaya*, 1962, nr. 4, p. 251—259.

WILDFUHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, partea I, p. 574—619.

ZINSSER J. — Textbook of bacteriology, ed. a II-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New-York, 1957, p. 334—357.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU MICROBI DIN GENUL *HAEMOPHILUS*

Familia *Brucelaceae*. Genul *Haemophilus*. Specia tip: *Haemophilus influenzae*

Generalităţi

Genul *Haemophilus* cuprinde bacterii hemofile sau hemoglobinofile, pentru care prezenţa sîngelui în mediile de cultură este necesară pentru stimularea dezvoltării. Sîngele total cuprinde 2 factori necesari creşterii *H. influenzae*; un factor termostabil, denumit X şi un factor termolabil, *V*. Ulterior s-a constatat că factorul „X'' este hemina, necesară bacteriei pentru sinteza sistemelor enzimatice citocromoxidază, a citocromului, a catalazei şi a peroxidazei, iar factorul „V'' care este o coenzimă pentru sinteza codehidrogenazelor. Factorul X poate fi supleat prin adaos de cisteină la mediu. Factorul V poate fi înlocuit prin extract de cartof sau extract de levură.

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

(Cocobacilul Pfeiffer)

A fost izolat de Pfeiffer, în 1892, de la cazurile de gripă epidemică şi pînă în 1918 a fost considerat ca agent etiologic al gripei. Astăzi rolul său este mai bine precizat şi se ştie că, în asociaţie cu streptococul, stafilococul şi pneumococul, produce infecţii secundare pulmonare în timpul epidemiilor de gripă. Singur sau în asociaţie provoacă infecţii severe ale sinusurilor, urechii mijlocii, faringelui şi căilor respiratorii superioare. *H. influenzae* este una din cauzele cele mai frecvente ale meningitelor la copii.

Morfologie şi coloraţie

Cocobacil de dimensiuni reduse, pleomorf, la limita vizibilităţii (0,2 — 0,4μ). În produsele patologice (spută, exsudat faringian etc.) este aşezat de obicei în diplo, în grămezi sau în lanţuri scurte, rareori izolat, înconjurat de o capsulă. Foarte adesea fagocitat în grămezi mici sau perechi aşezate paralel, intra- şi extracelular. În lichidul cefalorahidian predomină formele lungi şi filamentoase. În culturi, alături de formele tipice, apar uneori şi forme lungi şi pe măsură ce se învecheşte cultura, forme filamentoase. Există tulpini la care formele bacilare şi filamentoase predomină de la început. Microbul este imobil, gram-negativ. Se colorează bipolar, după coloraţie prelungită de 10 — 15 minute cu fucsină diluată 1/5 sau albastru de toluidină.

Caractere de cultură şi biochimice

H. influenzae este un microb strict adaptat la viaţa parazitară, cu un echipament enzimatic slab dezvoltat; aceasta face să necesite, pentru dezvoltare, un mediu complex bogat în factori nutritivi, cu adaos obligatoriu de factori de creştere, hemina sau factorul X şi coenzima „I'' sau factorul V.

Sîngele, extractul de globule roşii, precum şi unele bacterii şi levuri conţin ambii factori de creştere. Datorită faptului că unele bacterii, ca b. difteric, b. tific, b. coli, sarcina, stafilococul şi streptococul, pot elabora în mediu factorii de creştere necesari pentru *H. influenzae* apare fenomenul de satelitism, adică de creştere mai abundentă în apropierea coloniilor de stafilococ, streptococ etc.

Sîngele integral nu este favorabil creşterii bacteriene optime şi se preferă eliberarea componentelor hematiilor prin acţiunea căldurii sau digestiei peptice. În practică se realizează acest lucru prin încălzirea sîngelui defibrinat după amestecul cu geloză sau bulion timp de 5 minute la temperatura de 90°. În ceea ce priveşte provenienţa sîngelui, specia animală cea mai favorabilă dezvoltării hemofililor este iepurele şi omul.

Pe mediile solide coloniile apar după 24 de ore; ele sînt mici, plate, transparente, rotunde, amintind pe cele ale pneumococului. Coloniile cu aspect mucoid, lucioase aparţin tulpinilor capsulate. În culturi mai vechi apare disociaţia *S-R* şi apar, în plus, colonii *R* cu suprafaţa rugoasă şi marginile crestate.

Pe mediile lichide, bulion cu adaos de hemoglobină, se dezvoltă provocînd o tulburare uniformă, cu un depozit pulverulent sau format din flocoane mici, albicioase.

Metaboliţi bacterieni

H. influenzae produce un polizaharid capsular specific, care nu este toxic, dar care se acumulează în sînge şi lichidul cefalorahidian al indivizilor infectați și neutralizează anticorpii elaborați de organism ca răspuns la infecție.

Endotoxina, izolată de Dubos dintr-o tulpină *R*, omoară iepurele în doze de 0,1 mg. După imunizare cu doze subletale de toxină, iepurii rezistă la 50 D.L.M.

Rezistența

Vitalitatea slabă; în culturi trăiește pînă la 15 zile. Lipsit de umiditate, moare în cîteva ore la 37°.

Structura antigenică

Toate tulpinile virulente de *H. influenzae* posedă o capsulă de natură polizaharidică, care le protejează de acțiunea enzimelor leucocitare. Pe baza polizaharidelor capsulare prin reacții de precipitare sau de umflare a capsulei, tulpinile de *H. influenzae* au fost clasificate în 6 tipuri *a*, *b*, *c*, *d*, *e* și *f*. *H. influenzae* posedă fracțiuni antigenice comune cu pneumococul și serurile precipitante ale celor 2 microbi dau reacții încrucișate.

Boala experimentală

Culturile de *H. influenzae*, inoculate la șoarece, cobai și iepure în cantități mari și pe cale intraperitoneală, provoacă moartea prin toxemie acută, fără invazia organismului; culturile omorîte produc același efect, datorită endotoxinei bacilare.

Diagnosticul bacteriologic

Produsele patologice de examinat sînt: sputa, sîngele, lichidul cefalorahidian etc.

Pentru spută se face un examen direct, în care se caută cocobacili de dimensiuni mici, așezați caracteristic, gram-negativi, urmat de izolarea pe medii solide cu sînge. Eventual se poate urmări fenomenul de satelitism, însămînțînd o parte a mediului cu stafilococ sau colibacil.

Pentru sînge se practică hemocultură în bulion-sînge. Hemoculturile se controlează la 24 și 48 de ore după însămînțare și se fac subculturi pe medii solide cu geloză-sînge șocolat, pentru a obține colonii izolate. Coloniile izolate se controlează prin frotiu colorat gram și albastru de toluidină și se identifică serologic prin serurile anticapsulare de tip.

Pentru lichidul cefalorahidian se face un examen direct, din sedimentul obținut prin centrifugare și însămînțare pe plăci cu geloză-sînge șocolat pentru izolare în cultură pură.

Sensibilitatea la antibiotice și chimioterapice

H. influenzae este sensibil la sulfamide și antibiotice. Cazurile ușoare de meningită pot fi tratate cu sulfadiazină în doze corespunzătoare, timp de minimum 2 săptămîni. Dintre antibiotice, streptomicina și aureomicina sînt eficace; cloramfenicolul are acțiunea cea mai uniformă și constantă. Asocierea cloramfenicolului cu sulfadiazina este tratamentul de elecție pentru infecțiile grave. În cazurile de meningite grave, asociația medicamentoasă trebuie administrată un timp mai îndelungat, pentru a avea certitudinea sterilizării complete a spațiilor meningiene.

HAEMOPHILUS AEGYPTIUS

După vechea denumire, bacilul Koch și Weeks este agentul etiologic al conjunctivitei contagioase. A fost descoperit de Koch în 1883, din frotiurile bolnavilor de ochi din Egipt și izolat în cultură pură de Weeks, în 1887.

Este un bacil mic, gram-negativ, care necesită pentru creștere, factorii *X* și *V*. Se deosebește și este o specie independentă de *H. influenzae*. Reduce nitrații în nitriți, nu produce indol și aglutinează hematiile umane. Are o patogenitate redusă pentru șoareci, chiar cu adaos de mucină; omoară în schimb embrionul de găină de 8 zile. Produce o conjunctivită la voluntarii umani, dar nu la animalele de laborator.

Sulfamidele sînt eficiente în tratamentul conjunctivitelor cauzate de acest microorganism. Dintre antibiotice, streptomicina, clortetraciclina, oxitetraciclina și cloramfenicolul acționează la fel de eficace ca și sulfamidele.

HAEMOPHILUS DUCREYI

Este agentul etiologic al șancrului moale sau șancrului Ducrey al mucoaselor genitale. Aproximativ 10% din totalul infecțiilor venerice sînt determinate de *H. Ducreyi*. Microbul a fost descoperit în 1889 de către Ducrey, în secreția purulentă a șancrului.

Morfologie și colorație

Microbul este deosebit de mic și măsoară 1–1,5 μ, este nesporulat, imobil și gram-negativ. În exsudatele patologice din leziuni apare izolat, în lanțuri scurte sau în grămezi mici, atît extracelular, cît şi în interiorul fagocitelor. Colorat cu albastru de metilen Löffler sau tionină, se colorează bipolar.

Caractere de cultură

Aerob, cu temperatură optimă de desvoltare în jurul a 37°. Pentru izolare necesită sînge, cu prezenţa factorilor „X" şi „V"; după un număr de subculturi devine independent de prezenţa acestor factori de creştere.

Mediul de izolare din produsul patologic este geloza-sînge de iepure defibrinat, în proporţie de 20%, la pH = 7,2. După 24 de ore se dezvoltă colonii mici, rotunde, proeminente, lucioase, transparente, de culoare cenuşie, cu zonă de hemoliză în jurul coloniei.

Coloniile nu aderă la mediu şi pot fi deplasate uşor pe suprafaţa mediului cu ansa de platină; treptat devin opace şi capătă un luciu metalic asemănător cu cel al *B. pertussis*. În mediul bulion-sînge defibrinat de iepure creşte sub forma de flocoane fine.

Culturile de *H. Ducreyi* pot fi păstrate la temperatura camerei aproape 2 ani după liofilizare, fără ca să-şi piardă virulenţa.

Culturile mai pot fi păstrate săptămîni de zile în sînge gelozat şi amidonat 1%. Frotiurile din cultură arată un streptobacil în lanţuri lungi sau scurte.

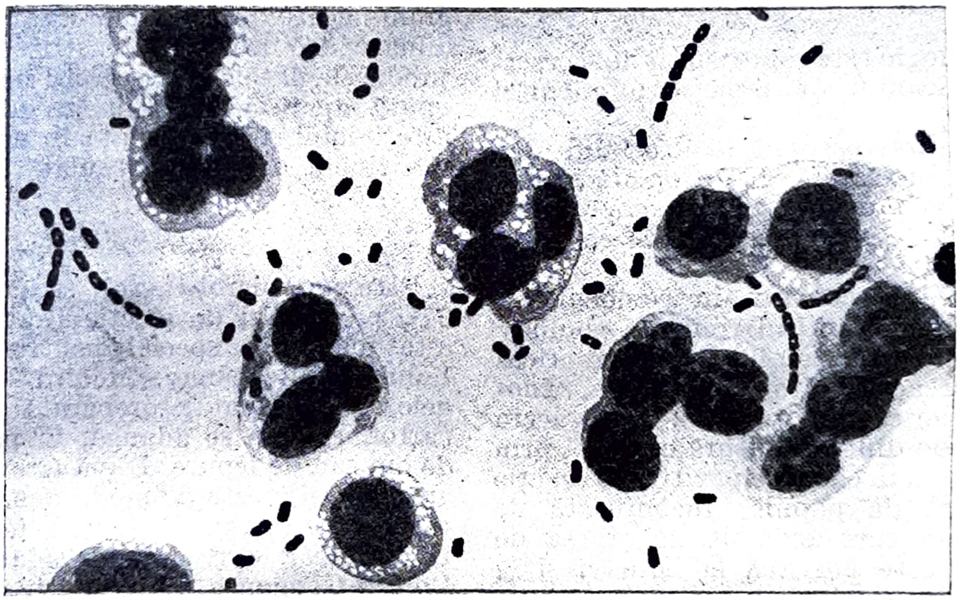


Fig. 325. — Haemophilus Ducreyi. Frotiu din secreţie de şancru moale. Se văd bacili aşezaţi în lanţuri şi izolaţi, unii fagocitaţi; coloraţie caracteristică bipolară cu tionină.

Rezistenţa

Rezistenţa *H. Ducreyi* în mediul extern este foarte redusă; este distrus repede de uscăciune şi antisepticele obişnuite. Nu este sensibil la penicilină, este moderat sensibil la sulfamide şi foarte sensibil la acţiunea streptomicinei şi clortetraciclinei.

Structura antigenică

Microbul conţine un antigen care sensibilizează ţesuturile bolnavului. Vaccinurile efectuate din culturi omorîte provoacă, dacă sînt injectate intradermic, o reacţie cutanată de tip alergic, care serveşte la diagnostic sub denumirea de reacţie Ito-Reenstierna.

Infecţia experimentală

Majoritatea animalelor de laborator sînt insensibile la acţiunea *H. Ducreyi*. Maimuţele superioare au putut fi infectate şi li s-a reprodus experimental şancrul. S-a mai reuşit infectarea embrionului de găină prin însămînţarea *H. Ducreyi* pe membrana corioalantoidă.

Infecţia la om

Incubaţia durează 4—10 zile, urmată de apariţia unei mici leziuni pe mucoasa organelor genitale, care este înconjurată de congestie și infiltrat inflamator. Leziunea se necrozează și se ulcerează, luînd aspectul unei leziuni ulcerative, cu margini neregulate, pe un fond de edem, dar lipsită de indurație. Lipsa indurației o deosebește net de șancrul sifilitic; de aici și denumirea de șancru moale. Adeseori mai multe ulcerații se întîlnesc la același bolnav. Infecția nu dă imunitate, șancrul este inoculabil la purtător. Un vaccin polivalent este utilizat pentru testele intradermice de alergie și pentru tratamentul infecțiilor cronice.

Diagnosticul de laborator

Produsul patologic este reprezentat de secreția șancrului sau lichidul de puncție a adenitei șancrului.

La examenul microscopic al frotiului din secreție, colorat cu Gram, se văd bacilii gram-negativi așezați în lanțuri; izolarea microbului se face în cultură pură pe medii solide cu sînge defibrinat.

Metodele indirecte constau în reinocularea produsului patologic intradermic la bolnav (șancrul moale este reinoculabil) și în practicarea intradermoreacției Ito-Reenstierna. Inocularea intradermică de 0,1—0,2 ml vaccin Ducrey (suspensie dintr-o cultură omorîtă prin căldură) determină, în cazurile pozitive, o reacție locală sub formă de papulă, înconjurată de o zonă de eritem care evidențiază starea de alergie. Reacția este pozitivă la bolnavi și la foștii bolnavi vindecați timp de ani de zile, ceea ce permite și un diagnostic retrospectiv.

Sensibilitatea la antibiotice și chimioterapice

Sulfadiazina pe cale orală și locală este eficientă. Streptomicina, cloramfenicolul și tetraciclinele sînt mai active și dau bune rezultate în toate cazurile care nu răspund la sulfadiazină.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU MICROBI DIN GENUL BORDETELLA

Familia *Brucellaceae*. Genul *Bordetella*. Specia tip: *Bordetella pertussis*.

Generalități

Bordetella pertussis sau bacilul tusei convulsive se aseamănă ca morfologie cu microbii din genul *Haemophilus*, se dezvoltă bine pe mediile cu sînge. Ulterior s-a dovedit că sîngele, cu cei doi factori X și V, nu este absolut necesar și că microbul se poate dezvolta la fel de bine pe medii sintetice, lipsite de sînge.

Bordetella pertussis

A fost descoperit în 1900, de Bordet și Gengou, în frotiurile de spută provenite de la copii bolnavi de tuse convulsivă.

Morfologie și colorație

B. pertussis este un cocobacil mic de 1—1,5 μ, gram-negativ, care se colorează bipolar cu fucsină diluată 1/5 sau cu albastru de toluidină. În produsele patologice, secreții nazofaringiene sau spută apare izolat sau în grămezi. Microbul este imobil și nesporulat; în exsudate și culturile tinere poate fi capsulat.

Caractere de cultură și biochimice

Este un microb aerob strict, se dezvoltă la 37°, pe mediul de elecție Bordet-Gengou, care este folosit în special pentru izolarea microbului de la bolnav. Mediul este compus din geloză glicerinată, preparată cu macerat de cartof, la care se adaugă, în părți egale, sînge de om sau de iepure. După cîteva treceri poate fi antrenat și crește pe medii uzuale, dar își pierde repede virulența. Pentru a favoriza creșterea *B. pertussis*, se recomandă adăugarea în mediul Bordet-Gengou a aproximativ 1 000 de unități de penicilină de placă Petri, care realizează inhibarea florei de asociație din produsul patologic.

Pe mediul Bordet-Gengou apar, după 24 de ore, colonii foarte mici, abia vizibile cu ochiul liber, care apoi se măresc după 48—72 de ore de incubație. Coloniile sînt de tip *S*, strălucitoare, proeminente, de nuanță cenușie cu margini net circumscrise. În subculturile ulterioare izolării, culturile se dezvoltă mai ușor și coloniile capătă un luciu metalic caracteristic. În cursul subculturilor apare disociația $S-R$, care este însoțită de modificări ale structurii antigenice. În jurul coloniilor pe mediul Bordet-Gengou se observă o zonă de hemoliză difuză caracteristică.

Pe mediile lichide (bulion cu glicerină și sînge) creșterea se manifestă prin tulburarea uniformă a mediului, însoțită de un sediment vîscos de culoare albicioasă. *B. pertussis* fermentează glucoza și lactoza, reduce nitrații în nitriți și nu produce indol. Alcalinizează și decolorează lent laptele turnesolat.

Rezistența

B. pertussis este repede distrus prin căldură (în 30 de minute la 55°), de uscăciune și de antiseptice. Microbul este rezistent la acțiunea sulfamidelor și penicilinei dar sensibil la tetraciclină și mai ales la cloramfenicol.

Metaboliți bacterieni și structură antigenică

În stadiile intermediare de variație $S-R$ în organismul infectat, tulpinile de *B. pertussis* secretă cantități mari de material mucilaginos, care se acumulează pe epiteliul ciliat al traheei. Se consideră că această blocare cu mucus a cililor epiteliului mucoasei traheale constituie factorul determinant în declanșarea acceselor de tuse caracteristică în infecția cu *B. pertussis*.

Din corpii bacterieni s-a izolat o toxină termostabilă, cu caractere de endotoxină. Endotoxina are o acțiune necrozantă, cînd este inoculată intradermic la iepure sau cobai, și una letală, cînd este inoculată pe cale intravenoasă. Efectul letal al endotoxinei *B.pertussis* asupra șoarecilor poate fi prevenit prin administrarea de antitoxină, dar nu prin ser antibacterian. Șoarecii infectați pe cale intranazală cu cultură de *Bordetella pertussis* beneficiază de tratamentul cu ser antibacterian, iar serul antitoxic rămîne fără efect. Tulpinile virulente de *B. pertussis* au un antigen de suprafață, care are o acțiune hemaglutinantă față de hematiile de om și șoarece. Antigenul hemaglutinant produce anticorpi specifici, dar nu protejează împotriva infecției. Cultivat pe medii fără sînge, *B. pertussis* suferă modificări ale structurii antigenice, care constituie 4 variante antigenice. Tipul I corespunde formei S virulente, toxice, așa cum se izolează de la bolnav. Tipurile II și III sînt tipuri intermediare $S-R$ producătoare de toxină, iar tipul IV reprezintă forma R avirulentă, lipsită de toxicitate.

Infecția experimentală

Culturile recent izolate sînt patogene pentru cobai și iepure. Inocularea intraperitoneală sau intravenoasă a unor doze mari de cultură de *B. pertussis* provoacă moartea animalelor prin toxemie. Culturile vechi, întreținute în laborator, își pierd treptat toxicitatea. Inocularea la șoarece pe cale intranazală, prin instilație după anestezie cu eter, constituie o metodă bună de a păstra virulența tulpinilor. Pentru testul de virulență se mai folosește și metoda inoculării intracerebrale la șoarece.

Infecția la om

B. pertussis se transmite la om pe cale respiratorie, prin tuse și strănut. Contagiunea interumană se realizează prin contactul direct cu bolnavii și cu purtătorii sănătoși de microbi. Purtătorii sănătoși sînt indivizi imuni din anturajul bolnavului, care vehiculează temporar microbii tusei convulsive.

Localizarea microbului în căile respiratorii se face pe epiteliul mucoasei și după o incubație de 7—14 zile, în care timp microbii se multiplică activ, începe faza catarală a bolii clinice, care se caracterizează prin coriză, strănut și tuse seacă. Faza catarală a bolii durează 10—14 zile, urmată apoi de faza spasmodică, care se caracterizează prin apariția acceselor de tuse cvintoasă forțată, care se succed foarte des. Această fază durează 2 săptămîni și este însoțită de apariția de zone de necroză și edem la nivelul epiteliului bronșic și eventual, de o pneumonie de tip interstițial. Bolnavul elimină cu dificultate o secreție mucoasă, aderentă și consistentă. În această perioadă spasmodică se instalează și o stare de hipersensibilitate față de proteinele *B. pertussis* sau alergia din tusea convulsivă. Convalescența durează 2—3 săptămîni și lasă organismul debilitat, susceptibil la apariția infecțiilor secundare, mai ales ale aparatului respirator. Boala prezintă încă o mare importanță epidemiologică, datorită incidenței ridicate, printre copii de vîrsta preșcolară mai ales.

Diagnosticul de laborator

În primele 2 săptămîni ale bolii, în faza catarală, microbul poate fi relativ ușor izolat prin însămînțarea directă a aerosolilor de salivă proiectați prin tuse. Plăcile Petri cu mediul Bordet-Gengou sînt expuse 10—15 secunde, la aproximativ 10—15 cm distanță de gura bolnavului. După o incubație de 24—48 de ore, la 37°, apar coloniile mici, abia vizibile, caracteristice. Către sfîrșitul bolii microbul poate fi izolat numai cu greutate și inconstant. După trecerea a 2 săptămîni de boală se utilizează, pentru diagnostic indicele opsono-citofagic. (I.O.C.), reacția de seroaglutinare și de fixare a complementului. De menționat, că datorită apariției destul de tardive a anticorpilor aglutinanți și fixatori de complement, valoarea acestor metode este de mai mică importanță pentru diagnostic. În tusea convulsivă se constată o creștere a numărului de leucocite din sîngele periferic și în formulă apare o limfocitoză marcată. În același timp se constată o mărire a puterii fagocitare, cu creșterea indicelui opsonocitofagic în primele 2 săptămîni de boală.

Tehnica de efectuare a I.O.C. în tusea convulsivă. Se recoltează din pulpa degetului 0,04 ml sînge, se amestecă cu 0,2 ml citrat de Na 4% și se adaugă 0,02 ml antigen pertussis, pentru I.O.C. preparat de Institutul „Dr. I. Cantacuzino".

Amestecul se menține 30 de minute la 37°, agitîndu-l din cînd în cînd. Se întind apoi frotiuri pe lame curate, degresate, care se usucă, se fixează cu alcool metilic 15—20 de minute și apoi se colorează 30—45 de minute cu soluția Giemsa. Se spală cu apă și se examinează la microscop, stabilind valoarea indicelui prin numărarea a 25—50 de polimorfonucleare, comparativ cu sîngele normal. Raportul dintre puterea opsonică a serului de cercetat și aceea a serului normal față de *B. pertussis* reprezintă indicele opsonocitofagic. Valori ale I.O.C. peste 3 la copiii sub 3 ani și peste 5 la copiii peste 5 ani sînt considerate ca valori crescute, datorite prezenței opsoninelor imune. I.O.C. arată valori crescute în 75—80% din cazurile de tuse convulsivă și poate fi astfel folosit ca un mijloc de diagnostic ajutător. La copiii mici, la care creșterile I.O.C. sînt mai constante, el are o valoare diagnostică certă.

Testul I.O.C. mai poate fi utilizat și pentru aprecierea imunității antipertussis după vaccinare.

Sensibilitatea la antibiotice și chimioterapice. Cloramfenicolul este antibioticul de elecție în tratamentul tusei convulsive. În lipsa lui pot fi folosite, cu bune rezultate, clortetraciclina și tetraciclina. Datorită faptului că infecția cu *B. pertussis* alergizează organismul, se pot asocia în cazurile grave de boală, la tratamentul cu antibiotice, antihistaminicele și corticoterapia.

În genul *Bordetella* se mai întîlnesc cîteva specii înrudite cu *B. pertussis*, care însă prezintă o importanță mai redusă din punctul de vedere al patologiei umane.

BORDETELLA PARAPERTUSSIS

Microbul a fost izolat de la copii cu forme ușoare de tuse convulsivă. Morfologia, structura antigenică și patogenitatea pentru animale sînt asemănătoare cu *B. pertussis*. Se dezvoltă ușor pe mediile de cultură și nu necesită factorii „X" și „V". Coloniile apar după 24 de ore, au aspect asemănător cu *B. pertussis* dar zona de hemoliză este mai evidentă și produce, în cursul dezvoltării, o pigmentare roșie-brună a mediului de cultură.

BORDETELLA BRONCHISEPTICA

Are de asemenea o serie de proprietăți comune cu *B. pertussis* și a fost izolată din unele cazuri benigne de tuse convulsivă. Este un cocobacil Gram-negativ, mobil, care se dezvoltă repede pe mediile cu sînge, nu produce pigment și nici hemoliză. Este patogen mai ales pentru cîini și iepuri; la om prezintă o patogenitate redusă.

MORAXELLA LACUNATA

Familia: *Brucellaceae*. Genul: *Moraxella*.

Specia: *Moraxella lacunata* sau diplobacilul Morax-Axenfeld a fost descoperit de Morax, în 1896. Este agentul etiologic al conjunctivitei subacute, o infecție catarală a conjunctivelor oculare. Inflamația este de obicei mai accentuată spre unghiul intern al ochiului și la nivelul carunculei lacrimale. Are o evoluție de inflamație subacută, cu tendința la cronicizare. Diagnosticul se face ușor, prin recoltarea de frotiuri prin amprente din secreția conjunctivală de la nivelul unghiului intern al ochiului, dimineața la sculare. Colorația Gram pune în evidență diplobacilii, gram-negativ, numeroși, intra- și extracelulari, cam de 2 µ lungime, cu capetele rotunjite net, ceea ce le imprimă o formă ușor ovoidă caracteristică. Izolarea microbului se poate face numai pe medii cu sînge sau cu ser. Încercările de a infecta maimuțele și animalele de laborator nu au reușit pînă în prezent. La om care rămîne singura specie sensibilă, conjunctivita subacută poate fi realizată pe cale experimentală.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU HAEMOPHILUS

Schema de diagnostic

Produs patologic: spută, exsudat faringian, lichid cefalorahidian

— *Pentru spută* se fac două frotiuri colorate cu Gram și albastru de toluidină. Se face reacția de umflare a capsulei cu seruri de tip.

— Se spală cîteva fragmente mucopurulente din spută cu soluție clorurosodică 8,5‰ sterilă și se însămînțează pe geloză-sînge chocolat.

- *Pentru exsudat faringean:*

Se însămînțează tamponul cu exsudat pe un sector al unei plăci cu geloză sînge-șocolat și se diseminează pe suprafața mediului cu o baghetă în „L".

- *Pentru lichid cefalorahidian:*
- Examen microscopic al sedimentului prin frotiuri colorate cu Gram, albastru de toluidină sau fucsină diluată și Giemsa.
- Se însămînțează din sediment cu ansa bacteriologică în striuri paralele pe suprafața unei plăci cu geloză-sînge șocolat.
- Controlul macroscopic cu lupa al coloniilor pe geloză-sînge șocolat. Se urmăresc în special coloniile mari cu aspect mucoid pentru că aparțin tulpinilor virulente capsulate, dar și cele mai mici transparente, ca picăturile de rouă, sînt ale tulpinilor de hemofili care însă și-au pierdut capsula.
- Controlul microscopic prin frotiuri colorate Gram a coloniilor tipice și efectuarea de subculturi pentru obținerea culturii pure pe geloză-sînge șocolat.
- Din cultură pură se efectuează următoarele teste de identificare și diferențiere cu *Bordetella*.

↓	↓	↓	↓	↓
Eventual, testarea sensibilității la antibiotice pe geloză-sînge șocolat prin metoda pulberilor de antibiotice	Identificare serologică a culturii cu serurile anticapsulare de tip	Realizarea testului de satelitism, prin însămînțare pe geloză-sînge obișnuită în prezența unei tulpini de stafilococ sau sarcina	Frotiu colorație Gram și albastru de toluidină pentru polimorfism și colorare bipolară	Testul biologic de diferențiere de *Bordetella*, prin inoculare intradermică la iepure sau cobai

Se redactează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, antigenice, biologice ale tulpinii izolate și eventual sensibilitatea la antibiotice.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUSEI CONVULSIVE

Schema de diagnostic

Produs patologic: exsudat faringean sau spută.

- Recoltarea dimineața pe nemîncate, direct pe placa Petri cu mediul Bordet-Gengou, a aerosolilor eliminați de copilul bolnav la sfîrșitul unei cvinte de tuse caracteristică. Placa se ține la 10—15 cm distanță de gura copilului și se acoperă imediat cu capacul după însămînțare.
- Eventul se poate recolta cu un tampon steril exsudat faringean sau sputa eliminată într-o cvintă de tuse. Tamponul cu exsudat sau un fragment din spută se însămînțează pe o placă Bordet-Gengou prin descărcare succesivă într-un sector al plăcii, apoi se diseminează pe toată suprafața cu ajutorul unei baghete în „L". Plăcile însămînțate se incubează la 37° timp de 1 pînă la 5 zile și se controlează zilnic.
- Se execută o leucogramă (numărătoare și formulă) pentru decelarea leucocitozei cu limfocitoză caracteristică infecției cu *Bordetella*.
- Se controlează cu lupa apariția coloniilor mici, care se dezvoltă lent (2—5 zile) abia vizibile cu luciu metalic, asemănătoare picăturilor de mercur cu zonă difuză de hemoliză. Diferențierea coloniilor trebuie efectuată în special cu cele de *Haemophilus influenzae* care se dezvoltă mai repede, 18—24 de ore, sînt translucide, asemănătoare picăturilor de rouă.
- Se efectuează controlul microscopic al coloniilor izolate caracteristice, prin frotiu colorat Gram și fucsină diluată sau albastru de toluidină. Prezența cocobacililor gram-negativi, colorați bipolar, confirmă colonia de *Bordetella*. Coloniile de Haemophilus prezintă în frotiu un polimorfism accentuat reprezentat de forme cocobacilare, bacilare și filamentoase.
- Din coloniile caracteristice se fac subculturi pe plăci cu Bordet-Gengou pentru obținerea culturii pure. Culturile secundare de *Bordetella* se dezvoltă mai repede, 24—48 de ore și se însoțesc de o zonă de hemoliză netă. Coloniile de *H. influenzae* nu sînt hemolitice.
- Din subculturi se efectuează o suspensie bacteriană concentrată, în soluție clorurosodică 8,5‰ sterilă care se folosește la :
  a) Testarea eventuală a sensibilității pe mediul Bordet-Gengou prin metoda difuzimetrică cu pulberi de antibiotice.
  b) Testul biologic de diferențiere, de *Haemophilus influenzae* prin proba intradermică la cobai. Se injectează 0,2 ml din suspensia bacteriană de cercetat, intradermic pe flancul epilat al unui iepure sau cobai. Se citește reacția țesutului după 24 și 48 de ore. În cazul că am injectat o suspensie de *Bordetella pertussis* apare după 12—18 ore în jurul locului de inocul un infiltrat ușor eritematos care în cîteva ore devine albăstrui și indică începutul necrozei care în interval de 24—48 de ore devine netă, cu un diametru de 1 cm și de culoare albastră-neagră.

  Dacă suspensia injectată a fost *Haemophilus influenzae*, după 24 de ore apare un infiltrat eritematos care se accentuează dar nu evoluează spre necroză. Eventual în centrul leziunii chiar la locul inoculului poate să apară o mică pustulă necrotică de 1—2 mm diametru, care se desprinde și se elimină.

După primele 2 săptămîni de boală diagnosticul bacteriologic este mai dificil. În această etapă a evoluției infecției vom efectua I.O.C. și eventual R.F.C. cu urmărirea creșterii dinamice a titrului.

Buletinul de analiză va cuprinde caracteristicile morfologice, de cultură, biologice și sensibilitatea la antibiotice a tulpinii izolate. Pe un buletin separat se va indica rezultatul leucogramei ; testul I.O.C. și eventual R.F.C., dacă s-au efectuat.

BIBLIOGRAFIE

ALEXANDER H. E. — Bacterial and Mycotic Infections of Man, editat de R. Dubos, ed. a 2-a, Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 515—547.

ANDREESCU VIORICA — Bacteriologie medicală, (sub red. prof. N. Nestorescu) Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 577—585 ; 585—589.

DYADYNOVA J. V. — Dinamica testului alergic cutanat la Pertussis, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*) 1962, nr. 3, p. 27—32.

DUMAS J., BORDET P. — Bactériologie médicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 361—371.

FANKOVSKAYA E. K. — Experienţa obţinerii de medii nutritive uscate, ex. mediul cu cazeină-carbon-agar pentru diagnosticul *B. pertussis*, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*) 1958, nr. 5, p. 17—21.

FROBISHER M. — Fundamentals of Bacteriology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Philadelphia, 1949, p. 777—784.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 545 ; 546—550 ; 550—560 ; 560—566 ; 484.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 194—204.

KOLMER J., BOERNER T. — Approwed Laboratory Tehniques, ed. a 4-a, Ed. Appleton-Century, New-York, 1945, p. 448—451.

KOLMER J. A. — Clinical diagnosis by laboratory examinations, Ed. Appleton-Century, New-York, 1944, p. 356, 367, 829—831.

KRASNOPEVTSEVA O. S. — Materiale pentru evaluarea mediilor cu carbon şi carbon-sînge pentru cultura *B. pertussis*, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1958, nr. 5, p. 21—25.

LAUTROP H. — Laboratory diagnosis of whoopingcough and Bordetella infections, *Bull. O.M.S.*, 1960, vol. 23, nr. 1, p. 15—35.

MACKIE T. J., MC CARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinbourgh, 1956, p. 491—500.

OSIPOVA P. V. — Agentul cauzal al bronhisepticemiei şi relaţiile sale cu *B. pertussis*, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1959, nr. 1, p. 33—36.

POPOVICI MARCELA — Bacteriologie medicală (sub. red. prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 623.

POSZGI N. — Bacteriologie medicală (sub. red. prof. N. Nestorescu şi colab.), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 590—598.

SINAI G. J. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, G. J. Sinai şi O. G. Birgher, (traducere din limba rusă), Ed. de stat pentru literatura ştiinţifică, Bucureşti, 1952 p. 264—268 ; 268—272 ; 273—275 ; 275.

SOARE IRINA — Diagnosticul de laborator al tusei convulsive, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1958, nr. 2, p. 97—108.

SOARE IRINA, GOLĂESCU MARIA, TEODORESCU ALEXANDRINA — Valoarea reacţiei opsonocitofagice în diagnosticul tusei convulsive, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1959, nr. 1, p. 87—91.

SOARE IRINA — Asupra unor cazuri de tuse convulsivă cu *Bordetella parapertussis*, apărute în Bucureşti, *Microbiologia (Bucureşti)*, 1959, nr. 5. p. 439—444.

STITT R. S., CLOUGH P., BRANHAM SARA — Practical Bacteriology, Hematology and Parasitology, ed. a 4-a, Ed. Blakiston, New-York, Toronto, 1948, p. 104—108.

TOPLEY AND WILSON'S—Principles of bacteriology and immunity, ed. a 4-a, Ed. Edward Arnold, Londra, 1955, vol. I, p. 896—897 ; 897—918 ; 918—919 ; 919—920 ; 920—921 ; vol. II p. 1 021—1 022 ; 1 645.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, partea I, p. 505—522.

WHITBY L., HYNES M. — Medical bacteriology, ed. a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 273—282.

ZINSSER J. — Textbook of bacteriology, ed. a 11-a, Ed. Appleton-Century, New-York, 1957, p. 287—295 ; 296—301 ; 301—302 ; 303.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU *ENTEROBACTERIACEAE*

Enterobacteriaceele cuprind microbi, larg răspîndiţi în natură, aerobi, Gram-negativ, nesporulaţi, de formă bacilară, majoritatea mobili, care se întîlnesc, atît în conţinutul intestinal al omului şi animalelor, cît şi în mediul înconjurător. După ultima clasificare internaţională acceptată, în ediţia 1958 a manualului lui Bergey, de „Bacteriologie determinativă'', microorganismele din familia enterobacteriaceelor se împart în 5 triburi : *Eschericheae*, *Ervinieae*, *Serratieae*, *Proteae* şi *Salmonelleae*. Din acestea, *Escherichiae*, *Proteae* şi *Salmonelleae* interesează îndeaproape patologia umană.

Tribul *Escherichieae* cuprinde 3 genuri : *Escherichia*, *Aerobacter* şi *Klebsiella*. Faptul că aceste bacterii sînt foarte asemănătoare între ele, ca morfologie şi habitat, a făcut să fie cuprinse şi sub denumirea de grup coliform şi să fie larg folosite ca indicator sanitar al impurificării surselor de apă potabilă. Acest grup coliform cuprinde bacili care fermentează lactoza, cu producere de acid şi gaze, Gram-negativ, care se diferenţiază între ei printr-o serie de caractere biochimice.

O serie de forme intermediare, variante, care nu fermentează sau fermentează lent lactoza, au fost denumite în trecut bacili paracolon sau paracolobactrum şi, în ultimul timp, datorită cercetărilor lui Kauffmann, grupul *Bethesda-Ballerup*. Împreună cu alte cîteva variante denumite grupul Arizona, aceste forme intermediare fac trecerea spre *Salmonelleae*.

Tribul *Salmonelleae* cuprinde 2 genuri : *Salmonella* şi *Shigella*, care la rîndul lor cuprind foarte numeroase specii patogene pentru om şi animale.

TABELUL 115

Schema caracteristicilor biochimice ale enterobacteriaceelor după Edwards şi Ewing

	Shigella	*Salmonella*	*Arizona*	*Escherichia*	*Proteus*	*Klebsiella*	*Serratia*	*Erwinia*
Fermentează glucoza	—	+	+	+	i	+	i	—
,, manitolul	i	+	+	+	i	+	+	+
,, adonitolul	—	—	—	—	i	+	—	+
,, dulcitolul	i	+	—	i	—	i	—	—
,, inozitolul	—	i	—	i	—	+	i	+
,, lactoza	—*	—	+—	+	—	+	i	i
,, salicina	—	—	—	i	i	+	+	+
,, sucroza	—*	—	—	i	i	+	+	+
Reacţia indol	i	—	—	+	i	—	—	—
,, roşu de metil	+	+	+	+	+	—	+	i
,, Voges-Proskauer	—	—	—	—	i	+	—	i
Mediul cu citrat Simmons	—	+	+	—	i	+	+	—
,, pentru uree	—	—	—	—	+	+—	—	—
,, ,, KCN	—	—	—	—	+	+	+	—
,, ,, H_2S	—	+	+	—	i	—	—	+
,, ,, gelatină	—	—	+	—	i	—	i	+
,, ,, nitraţi	+	+	+	+	+	+	+	+
Mobilitate	—	+	+	+	i	—	+	+

Legendă : + = pozitiv ;
i = inconstant ;
— = negativ ;
* = *Shigella sonnei* fermentează lent.

Numeroasele specii din familia enterobacteriaceelor se studiază folosind reacţii biochimice variate şi se identifică prin metode serologice, pe baza structurii antigenice caracteristice. La unele dintre ele se poate stabili tipul bacteriofagic, metodă de reală utilitate în investigaţiile epidemiologice.

Trecerea între *Salmonella* şi *Shigella* o realizează bacteriile clasificate în genul *Alcaligenes*, cu specia tip *Alcaligenes faecalis*, care se găseşte în intestinul mamiferelor, pe sol şi în apă. Sînt bacterii parazite facultativ, cu rol patogen imprecis determinat, care au fost izolate din unele meningite, septicemii sau infecţii urinare la copii.

Edwards şi Ewing au schematizat, în 1955, principalele reacţii biochimice caracteristice de specie ale celor mai importante grupuri de enterobacterii patogene. Le redăm sub forma unui tabel (nr. 115).

Datorită faptului că sub acţiunea diferiţilor factori din mediul înconjurător fenomenul de variabilitate microbiană apare destul de frecvent la tulpinile de enterobacteriacee, asistăm la o largă varietate a reacţiilor biochimice caracteristice de specie. În aceste condiţii, pentru a nu complica diagnosticul de laborator, ne vom orienta totdeauna pentru caracterizarea unei tulpini de enterobacteriacee, în primul rînd pe identificarea serologică pe baza structurii antigenice de grup şi de tip, iar în al doilea rînd, pe prezenţa majorităţii caracteristicilor biochimice de specie.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU COLIBACILI

Genul : *Escherichia*. Specia tip : *Escherichia coli*

Generalităţi

Colibacilul sau *Esch. coli* este microbul care predomină în flora intestinală a omului şi animalelor. Microbii ajung în intestinul uman la scurt timp după naştere şi persistă toată viaţa. Sînt mai numeroşi în porţiunea ileocecală a intestinului şi diminuează treptat spre duoden şi rect. Colibacilii trăiesc în intestin într-o formă de parazitism comensal şi îndeplinesc un rol fiziologic, prin sinteza unor cantităţi importante de vitamine necesare organismului. Probabil că rolul florei coliforme în intestin este şi de a opri dezvoltarea altor microorganisme, cum sînt cele din flora proteolitică, şi chiar unele bacterii patogene. Cercetările efectuate în acest sens au putut dovedi că anumite tulpini de *Esch. coli* secretă metaboliţi de natură polipeptidică, denumite „colicine" care manifestă o marcată acţiune antibiotică faţă de alte tulpini de *Esch. coli* şi unele tulpini de *Shigella*.

Colibacilii pot, în anumite condiţii, să treacă din starea de parazitism comensal, la care s-au adaptat în intestin, la starea de patogenitate, determinînd la om infecţii a căror gravitate depinde de localizarea microbului şi de gradul de rezistenţă naturală a organismului infectat. Colibacilul poate provoca la om infecţii localizate şi generalizate. Mai frecvent întîlnite la adult sînt infecţiile urinare, cistite, pielite, pielonefrite, abcese perineale. Are rol în determinarea infecţiilor căilor genitale singur sau în asociaţie, provocînd metrite, salpingite, anexite, salpingoovarite, peritonite, precum şi unele infecţii ale căilor biliare, ca angiocolite, colecistite, abcese etc.

Infecţiile generalizate provocate de colibacili sînt rare la adult, mai frecvente la copii, fiind reprezentate de septicemie şi endocardită lentă. Colibacilul a fost izolat ca agent cauzal al meningitei, mai ales la copii.

Colibacilii sînt agenţii etiologici ai cazurilor sporadice de diaree neepidemică de vară, la copii în vîrstă de 2—3 ani. Colibacilul este încriminat ca agent cauzal al sindromului toxienteric epidemic al nou-născuţilor, infecţie deosebit de gravă, cu procent ridicat de mortalitate. Se ştie astăzi că numai anumite tulpini de colibacili, cu structură antigenică bine determinată, pe baza antigenului somatic şi capsular, de pildă ca : $O_{111}B_4$; $O_{55}B_5$; $O_{26}B_6$; $O_{86}B_7$ O_{119} B_{14} ; O_{125} B_{15} ; O_{126} B_{16} etc., sînt capabile să provoace sindromul. Prezenţa colibacililor intestinali în apa de băut sau în alimente indică contaminarea acestora cu floră intestinală şi poate fi folosită astfel ca indicator sanitar. Prezenţa lor în apă şi alimente indică posibilitatea transmiterii prin apa contaminată a bacteriilor patogene enterice care provoacă epidemii hidrice, ca : febra tifoidă, dizenteria şi holera.

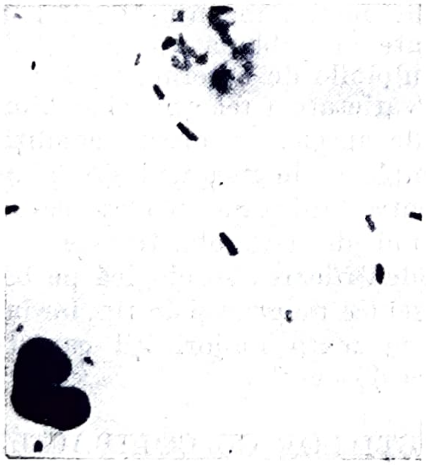


Fig. 326. — Escherichia coli. Frotiu din sediment urinar. Se văd bacili şi leucocite (coloraţie Gram).

Diagnosticul de laborator

Recoltarea produselor patologice se face în funcţie de localizarea infecţiei : din urină, prin tehnica uroculturii ; din căile biliare, prin tubaj duodenal sau prin hemocultură în caz de septicemie. În cazul sindromului toxienteric al nou-născutului se recoltează sînge şi materii fecale sau fragmente din organe la autopsie ; în cazurile de meningite, lichidul cefalorahidian.

Insămînţare şi izolare

Colibacilul se dezvoltă uşor pe medii uzuale, aşa că pentru izolare este suficient un tub cu bulion şi un tub cu geloză înclinată. Urina sterilă, recoltată prin cateterism, se centrifughează într-un tub steril şi din sediment se însămînţează cîteva picături în bulion şi pe suprafaţa unui tub cu geloză înclinată. Din puroi se însămînţează un fragment cu ansa într-un tub cu bulion şi apoi, fără a flamba, se trece ansa în lichidul de condensare al unui tub cu geloză înclinată, după care se epuizează încărcătura ansei prin mişcări de şerpuire pe suprafaţa gelozei. Culturile se incubează timp de 24 de ore la 37°. Colibacilii se dezvoltă tulburînd uniform bulionul, iar pe geloză înclinată, sub formă de colonii lucioase, rotunde, opace, cu marginile regulate. Patogenitatea este legată de forma „S" ; există şi variante „M" mucoide şi „R". Culturile de *Esch. coli* au un miros fecaloid caracteristic.

Identificarea se face prin stabilirea caracterelor morfologice, tinctoriale, de cultură, biochimice şi antigenice ale microbului izolat în cultură pură.

Caractere morfologice şi tinctoriale: bacili scurţi, cu capetele rotunjite, mobili, Gram-negativ, aerobi, nesporulaţi ; unele tulpini pot prezenta o capsulă discretă.

Caractere de cultură şi biochimice : pe medii de cultură lactozate se evidenţiază principala caracteristică biochimică a colibacilului: fermentarea lactozei. Obișnuit, se folosește, în acest scop, mediul Drigalski, geloză-lactozată turnesolată, pe care coloniile de colibacil se dezvoltă ușor și iau o culoare roșie, datorită fermentării lactozei și virajului turnesolului prin acidificare. Alte medii diferențiale care se mai întrebuințează pentru colibacili sînt mediul Istrate-Meitert sau Vogelsang, cu lactoză și albastru de bromtimol ca indicator, pe care colibacilii se dezvoltă sub formă de colonii galbene, și mediul Levin, compus din agar, eozină, albastru de metilen, pe care *Esch. coli* se dezvoltă sub formă de colonii violet-albastre, cu reflexe metalice caracteristice.

În afara lactozei, colibacilul fermentează și alte mono- și dizaharide, ca glucoza, arabinoza, manitolul, levuloza, galactoza, maltoza etc., care însă nu sînt importante pentru diagnosticul de specie, ci numai pentru diferențieri biochimice de alte enterobacterii. Însămînțat pe gelatină, colibacilul crește, fără a lichefia gelatina. Pe mediul cu agar — subacetat de plumb crește fără a înnegri mediul, deci nu produce H_2S. Pentru diferențierea biochimică a colibacililor în cadrul grupului coliform și cu celelalte enterobacterii se folosesc 4 reacții exprimate obișnuit prin formula mnemotehnică „*I. M. Vi. C.*“ :

I = reacția indolului;
M = reacția cu roșu de metil;
Vi = reacția Voges-Proskauer sau evidențierea formării de acetilmetilcarbinol;
C = dezvoltarea pe medii cu citrat de Na.

Reacția indolului. *Esch. coli* are capacitatea de a produce indol din peptonă, în cursul dezvoltării pe medii cu peptonă. Evidențierea producerii de indol se poate face prin mai multe metode. Cele mai curent folosite sînt:

Metoda Ehrlich-Kovacs: la o cultură de colibacili de cel puțin 48 de ore, în apă peptonată se adaugă cîteva picături de eter sulfuric și 0,3 ml de reactiv Ehrlich-Kovacs. Se agită puțin cultura și se lasă apoi în repaus; în cazul reacției pozitive, în cîteva minute apare un inel de culoare roșie închis, care denotă prezența indolului. Apariția unui inel de culoare galbenă indică o reacție negativă.

Formula reactivului Ehrlich-Kovacs

Paradimetilaminobenzaldehid	5 g
Alcool amilic pur	75 g
Acid clorhidric concentrat	25 ml

Metoda Salkowski: la o cultură de colibacili de 48 de ore în apă peptonată, se adaugă 6 picături nitrit de Na 1‰, apoi 12 picături de acid sulfuric concentrat. Apariția inelului de culoare roșie închis indică o reacție pozitivă.

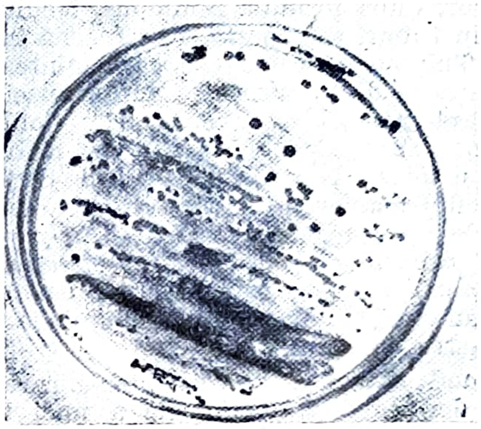


Fig. 327. — Colonii izolate de *Escherichia coli* pe mediul Levin (EMB).

Reacția cu roșu de metil, se bazează pe proprietatea colibacilului intestinal de a fermenta glucoza, cu producerea unei cantități mari de acid. Reacția se face folosind o cultură de 48 de ore, pe un mediu glucozat după formula Clark și Lubs, la care se adaugă cîteva picături dintr-o soluție alcoolică 0,02% de roșu de metil. Soluția de roșu de metil are rolul de indicator de pH; cînd producerea de acid este mare, indicatorul își menține culoarea roșie, reacția este pozitivă; cînd cantitatea de acid este mai mică, indicatorul virează spre galben, reacția este negativă.

Reacția Voges-Proskauer, se bazează pe proprietatea unor bacterii de a fermenta glucoza, cu producerea unui metabolit intermediar: acetilmetilcarbinolul. Tulpina microbiană de cercetat se însămînțează pe mediul lichid glucozat Clark și Lubs și după o incubație de 3—4 zile la 37°, se adaugă la 3 ml cultură o cantitate egală de soluție de hidroxid de K 40%. Amestecul se menține cîteva minute în apă fierbinte și apoi se adaugă cîteva picături de apă oxigenată sau 1 ml reactiv Baritt (5 g de α-naftol în 100 ml alcool etilic absolut. Apariția unei culori roz pînă la roșu indică prezența acetilmetilcarbinolului. Colibacilul intestinal nu are capacitatea de a produce acetilmetilcarbinol; colibacilul aerogen produce o cantitate mare de acetilmetilcarbinol.

Creșterea pe medii cu citrat de Na. Acest test se bazează pe capacitatea unor bacterii de a folosi citratul de Na ca sursă unică de carbon necesară creșterii. Se folosesc în acest scop, fie mediul lichid Koser, fie preferabil mediul cu agar și albastru de bromtimol, ca indicator, după formula Simmons. Mediul preparat în tuburi se topește și se toarnă în plăci Petri. Tulpina de cercetat se însămînțează pe suprafața mediului prin epuizarea ansei și se incubează 24–48 de ore la 37°. Colibacilul intestinal nu are capacitatea de a utiliza citratul și nu se dezvoltă pe mediul Simmons. Colibacilul aerogen și alte enterobacterii, ca klebsiele și unele salmonele, *S. paratyphi* B, *S. enteritidis Gärtner*, *S. choleraesuis*, *S. typhi murium* etc. se dezvoltă abundent și provoacă un viraj de culoare a mediului de la verde, la albastru ca cerul.

În mod obișnuit, pentru identificarea din punct de vedere bacteriologic a unei tulpini de *Esch. coli* izolate din urină, puroi sau alte produse patologice din infecții ale adultului se consideră suficiente, pentru diagnosticul de specie, următoarele caractere: bacili scurți cu capetele rotunjite, mobili, Gram-negativ care fermentează lactoza cu reacția indolului și roșului de metil pozitive. În cazul tulpinilor de *Esch. coli* izolate din enteritele de vară infantile și mai ales din cazurile de sindrom toxienteric al nou-născuților, se impune completarea caracteristicilor bacteriologice de specie cu cele de structură antigenică.

Structura antigenică a *Esch. coli* este tot atît de variată și complexă ca și aceea a salmonelelor și shigelelor. Kauffmann descrie 3 antigene, unul somatic O, termostabil, și 2 termolabile, *H* flagelar monofazic și *K* de înveliș sau capsular. Antigenele *K* reprezintă un grup complex, alcătuit în proporții variate de fracțiuni antigenice *L*, *A* și *B*.

Antigenul L este fracțiunea de înveliș, termolabilă la 100°, analogă antigenului „*Vi*" al salmonelelor, și prezența lui poate face tulpina „O" inaglutinabilă.

Antigenul A este omologul fracțiunilor antigenice capsulare ale pneumococului, este distrus într-o oră la 120°, deci relativ termostabil. Se găsește în cantitate mare la tulpinile de *Esch. coli*, care dau colonii mucoase „*M*".

Antigenul B este o fracțiune antigenică de înveliș, termostabilă, care se întîlnește rar, numai la anumite tulpini de *Esch. coli*. În general, tulpinile de *Esch. coli* care conțin complexul antigenic *K* sînt mai toxice și rezistă acțiunii fagocitozei și bacteriofagilor specifici.

Pe baza cunoașterii structurii antigenice a colibacililor, Kauffmann, Knipschildt și Vahlne au elaborat o schemă antigenică de diagnostic în care tulpinile patogene cuprind primele 25 de grupuri serologice.

Identificarea serologică a tulpinilor de *Esch. coli* se folosește în practica diagnosticului de laborator numai parțial, pentru identificarea tulpinilor enteropatogene, care posedă fracțiunea antigenică *B* care în ultimii ani au fost incriminate ca agenți etiologici ai enteritelor infantile și mai ales ai sindromului toxienteric al nou-născuților. Pentru ușurința identificării tulpinilor de *Esch. coli* cu antigen *B* și datorită relativei rarități a acestor tulpini, se procedează astfel: tulpina de identificat se dispersează pe o placă de geloză simplă și se procedează la aglutinarea pe lamă a minimum 10 colonii izolate din tulpina de cercetat.

Aglutinarea pe lamă se face folosind un ser polivalent anticoli, preparat cu următoarele tulpini, mai frecvent întîlnite în sindromul toxienteric: O_{111} B_4; O_{55} B_5; $O_{26}B_6$ și O_{86} B_7; O_{119} B_{14}; O_{125} B_{15}; O_{126} B_{16}. Serul polivalent se folosește numai pentru aglutinări pe lamă.

Coloniile lactozopozitive care au aglutinat pe lamă cu serul polivalent se aglutinează, în continuare, pe lamă, cu ajutorul serurilor monovalente. Tulpinile care aglutinează pe lamă cu ser monovalent urmează să fie examinate și prin aglutinare în tuburi, care sînt citite, după o incubare de 2 ore, la 37° și după 20 de ore de păstrare la temperatura camerei. Trusa de seruri aglutinante pentru *Esch. coli* este preparată și livrată de Institutul „Dr. I. Cantacuzino".

În sfîrșit, în cazul tulpinilor de *Esch. coli*, izolate dintr-un sindrom toxienteric epidemic al nou-născuților, într-o colectivitate închisă, se poate folosi, ca metodă suplimentară de diagnostic, utilă investigațiilor epidemiologice, lizotipia cu bacteriofag anticoli.

În cazul tulpinilor de *Esch. coli* O_{111} B_4, s-au individualizat 7 tipuri bacteriofagice, la tulpinile $O_{55}B_5$ de asemenea, 7 tipuri bacteriofagice, iar la tulpinile $O_{26}B_6$, 5 tipuri bacteriofagice.

Infecțiile cu colibacili nu dau o imunitate durabilă ci, dimpotrivă, au o tendință supărătoare spre cronicitate şi recidivă. Din aceste motive, nu există tratament şi profilaxie specifică.

Esch. coli este sensibil la sulfatiazol şi alţi derivaţi sulfamidaţi. Rezistent la penicilină, datorită capacităţii de a elabora o enzimă (penicilinaza) care inactivează penicilina. Este sensibil la streptomicină, cloramfenicol, aureomicină, tetraciclină etc.

Determinarea sensibilităţii la antibiotice a tulpinii de colibacil izolate este necesară numai în cazul infecţiilor recidivante sau cronice.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECŢIILE CU COLIBACILI

Schema de diagnostic

Produse patologice : urină, materii fecale, sînge, puroi, lichid cefalorahidian, alimente contaminate

- Sedimentul urinar, suspensie din materii fecale sau puroi în ser fiziologic steril, se însămînţează în bulion şi prin tehnica epuizării ansei pe suprafaţa unui mediu diferenţial pentru colibacil ; mediul : Drigalski, Vogelsang, Levine sau Istrate -Meitert.
- Sîngele în cantitate de 10—15 ml se însămînţează prin tehnica hemoculturii cu acul montat la un balon cu 200 ml bulion simplu.
- Sedimentul lichidului cefalorahidian obţinut prin centrifugare în 2 tuburi separate servesc : unul la însămînţarea în bulion, mediul Drigalski şi geloză-sînge ; al doilea la efectuarea frotiurilor care se colorează cu Gram, albastru de metilen şi Giemsa.
- Din hemocultură se fac zilnic subculturi pe Drigalski şi Vogelsang sau Levine.
- Se controlează bulionul însămînţat pentru prezenţa bacililor mobili Gram-negativ prin examen între lamă şi lamelă şi frotiu colorat Gram.
- Se controlează macroscopic apariţia coloniilor lactozo-pozitive, rotunde, opace, convexe, lucioase cu miros fecaloid, de culoare roşie pe mediul Drigalski ; galbene, pe mediul Vogelsang şi Istrate-Meitert ; violete închis cu luciu metalic, pe mediul Levine.
- Coloniile izolate caracteristice se controlează prin frotiu colorat Gram şi se subcultivă în bulion şi pe o placă cu geloză pentru obţinerea culturii pure.
- Subculturile se controlează pentru puritate prin frotiu colorat Gram şi apoi se fac însămînţările pentru testele biochimice :

↓ În apă peptonată, pentru reacţia indolului

↓ În mediul Clark şi Lubs, pentru reacţiile roşu de metil şi Voges-Proskauer

↓ Pe mediul Simmonds, pentru creşterea în prezenţa citratului de Na ca sursă unică de carbon

- Din cultura în bulion de 12—18 ore se efectuează testarea sensibilităţii la antibiotice prin metoda difuzimetrică calitativă în agar cu pulberi de antibiotice.
- Identificările serologice se fac pentru tulpinile enteropatogene posesoare de antigen K cu fracţiunea antigenică de înveliş B. Se aglutinează pe lamă minimum 10 colonii izolate din placa cu geloză, cu ser polivalent. Coloniile pozitive la aglutinarea cu ser polivalent se trec pe o geloză înclinată şi se aglutinează după 24 de ore cu serurile monovalente $O_{111}B_4$, $O_{55}B_5$, $O_{26}B_6$, $O_{86}B_7$, etc. pe lamă şi în tuburi.

Se eliberează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, biochimice şi eventual structura antigenică şi spectrul de sensibilitate la antibiotice ale tulpinii de colibacil izolate.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECŢIILE CU BACTERII DIN GENUL *KLEBSIELLA*

Familia : *Enterobacteriaceae* : Genul *Klebsiella*.
Specia tip : *Klebsiella pneumoniae*. Sin. : pneumobacilul Friedländer.

Generalităţi

Microbul a fost descoperit de către Friedländer în 1882, într-o spută provenită de la un bolnav de pneumonie. Poate fi găsit în căile respiratorii şi în intestinul individului sănătos. Se pune în evidenţă în boli ale aparatului respirator, bronşite, bronşiectazii, pneumonii, afecţiuni ale căilor urinare, septicemii. În genul *Klebsiella*, în afara *K. pneumoniae*, sînt cuprinse încă 2 specii, *K. ozenae*, *K. rhinoscleromatis*.

Morfologie

Examinat în produsele patologice, microbul apare, de cele mai multe ori, ca un cocobacil de 0,5—2 μ lungime, înconjurat de o capsulă de 2—3 ori mai mare decît diametrul microbului. Este Gram-negativ, imobil şi nesporulat.

Caractere de cultură

Pneumobacilul Friedländer, aerob şi microaerofil, creşte uşor pe mediile uzuale şi cu compoziţie simplă. Bulionul este tulburat uniform şi devine vîscos, semănînd cu gelatina lichefiată. Pe geloză dă colonii albe mucoase, mari, de pe suprafaţa cărora, cînd sînt atinse, se desprind filamente subţiri de mucus. Un diagnostic de prezumţie poate fi făcut după aspectul caracteristic al coloniilor.

Coloniile cu aspect mucoid sînt virulente şi considerate ca forma „*S*" de către unii cercetători, în timp ce alţii le consideră colonii „*M*". Există şi colonii „*R*", care conţin germeni nemucogeni şi avirulenţi. Germenii care compun aceste colonii sînt lipsiţi de capsulă. Creşterea optimă se face la 35—37°.

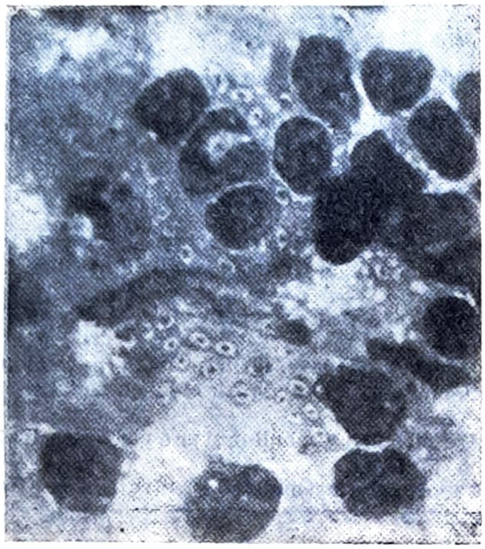


Fig. 328. — Klebsiella pneumoniae. Frotiu din splina unui şoarece infectat experimental (coloraţie Manson) (colecţia autorului).

Rezistenţa

Este rezistent la uscăciune. La temperatura camerei culturile rămîn viabile luni de zile. Este distrus rapid la 60°.

Creşterea lui este inhibată de sulfamide şi de streptomicină; este rezistent la acţiunea penicilinei.

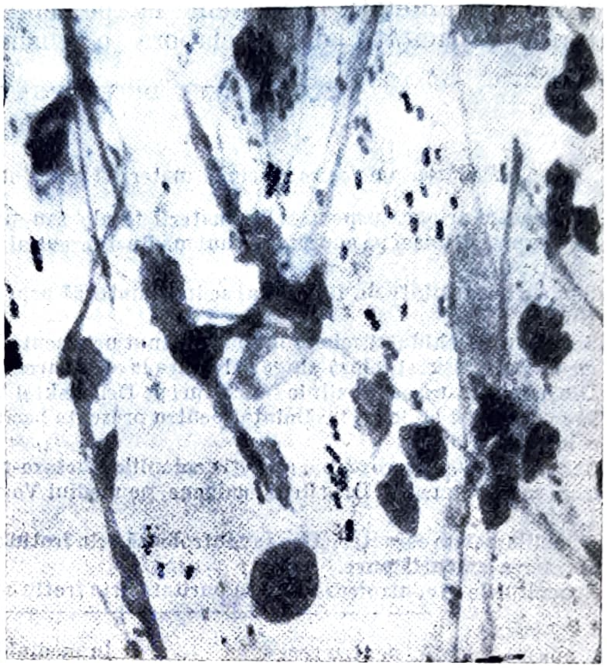


Fig. 329. — Klebsiella pneumoniae. Frotiu din spută (coloraţie Gram) (colecţia autorului).

Schema reacţiilor de diferenţiere biochimică în interiorul genului *Klebsiella*

Specia	Glucoză	Maltoză	Manită	Lactoză în 8 zile	Zaharoză în 10 zile	Amigdalină în 4 zile	Inozitol	Adonitol	Lapte turnesolat	Roşu de metil	Voges-Proskauer	Creştere pe medii cu citrat	Creştere pe medii biliate	Hidroliza ureei
Kl. pneumoniae	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	A R	V	V	V	+	+
Kl. ozenae	+	+	+	+ tardiv	±	±	−	+	C	+	−	−	−	−
Kl. rhinoscleromatis	+	+	+	−	+ g	−	+	+	A	+	−	−	−	−

Legendă: $\left.\begin{matrix}+\\g\end{matrix}\right\}$ = fermentare cu producere de gaz;
+ = reacţie pozitivă;
A = acidifică;
AR = acidifică şi reduce;
C = coagulează;
V = variabil.

Structura antigenică

Klebsiella pneumoniae are o structură antigenică asemănătoare cu cea a pneumococilor. Specificitatea de grup este imprimată de antigenul somatic, iar polizaharidul capsular acordă specificitatea de tip.

Kauffmann distinge 3 antigene diferite:

1. antigenul capsular, denumit antigen *K*;
2. antigenul somatic al formei *S*, denumit antigen *O*;
3. antigenul somatic al formei *R*, denumit antigen *R*.

După Kauffmann, învelişul mucoid, capsula şi antigenul *O* sînt de natură polizaharidică, iar antigenul *R* este o proteină. Aceste antigene pot coexista paralel la aceeaşi bacterie, în proporţii cantitative diferite.

Patogenitate pentru om şi animale

Friedländer credea, că microbul descoperit de el este agentul etiologic al pneumoniei francă lobară.

Cercetările lui Perlman şi Bulowa au demonstrat că numai o mică parte din cazurile diagnosticate clinic ca pneumonie sînt cauzate de pneumobacilul Friedländer. Infecţiile căilor urinare, căilor biliare, provocate de *Klebsiella pneumoniae* sînt destul de frecvente, putîndu-se complica cu septicemii. În ultimii ani, în urma folosirii largi a antibioticelor, tulpinile de *Klebsiella* se întîlnesc tot mai frecvent în infecţiile din mediul de spital şi uneori se prezintă cu caracterele unei infecţii intraspitaliceşti.

Şoarecele prezintă o sensibilitate deosebită, asemănătoare cu cea faţă de pneumococ, la infecţia experimentală cu pneumobacilul Friedländer. Cînd calea de inoculare este cea intraperitoneală, animalul moare cu peritonită şi septicemie.

Cobaiul şi iepurele au o rezistenţă marcată faţă de *Klebsiella pneumoniae*. Cîinele inoculat intratraheal face o pneumonie caracteristică.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul de laborator se bazează pe recoltarea produsului patologic, spută, bilă, urină etc. Din spută se efectuează 2 frotiuri care se colorează unul cu Gram şi al doilea cu albastru de metilen. La examenul microscopic direct apar sub formă de bacili scurţi Gram-negativ, izolaţi sau în diplo, înconjuraţi de o capsulă mare care depăşeşte de 2—3 ori diametrul corpului bacilar şi uneori fagocitaţi de leucocite.

Însămînţarea se face în bulion şi geloză înclinată, pe care creşterea se manifestă prin tulburarea intensă a bulionului care, devine vîscos şi prin apariţia de colonii izolate, mari, cu aspect mucoid caracteristic. Dintr-o colonie izolată se efectuează un frotiu colorat cu Gram şi eventual unul pentru colorarea capsulei prin metoda Hiss. Microbii apar caracteristic aşezaţi în diplo sau izolaţi, Gram-negativ, incapsulaţi. Colorată după metoda Hiss, capsula apare colorată roz, iar corpii bacilari violet. Metoda cea mai rapidă şi sigură de izolare a klebsielelor din spută este inocularea subcutanată la şoarece.

Datorită susceptibilităţii deosebite a organismului şoarecelui faţă de infecţiile cu *Klebsiella*, microbii injectaţi subcutanat pătrund rapid în circulaţia generală, unde se înmulţesc activ şi determină o infecţie de tip septicemic cu evoluţie mortală în 24—48 de ore.

La autopsia şoarecelui infectat experimental se pot izola klebsielele în cultură pură, prin tehnica hemoculturii din inima şoarecelui. Din organele bogat vascularizate, splină şi ficat, se efectuează frotiuri prin amprente şi se colorează Gram şi albastru de metilen. Klebsielele apar deosebit de numeroase, Gram-negativ, încapsulate caracteristic, mai ales la periferia frotiului.

Diferenţierea speciilor de *Klebsiella* în interiorul genului este laborioasă şi posibilă numai pe baza caracterelor biochimice.

De aceea, în practica diagnosticului de laborator, este suficientă pentru identificare, stabilirea caracterelor morfologice, de cultură şi de patogenitate pe şoarece. Deoarece există o comportare variabilă faţă de antibiotice a diferitelor tulpini de *Klebsiella*, este întotdeauna util să se efectueze testarea sensibilităţii la antibiotice a tulpinii de *Klebsiella*, izolată din produsul patologic.

În cazurile în care produsul patologic este reprezentat de bilă sau urină, se efectuează centrifugarea produsului în cupe sterile, iar sedimentul se examinează prin frotiuri directe colorate cu Gram şi albastru de metilen se însămînţează în bulion şi geloză înclinată şi se inoculează subcutanat la şoarecele alb.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECŢIILE CU *KLEBSIELLA*

Schema de diagnostic

Produse patologice : spută, bilă, urină, sînge

- Din spută se fac frotiuri directe colorate cu Gram şi albastru de metilen. Prezenţa diplobacililor încapsulaţi, Gram-negativ, eventual fagocitaţi, reprezintă un prim indiciu de infecţie a aparatului respirator cu *Klebsiella*.
- Bila şi urina recoltate steril prin sondaj se centrifughează în prealabil şi sedimentul se însămînţează în bulion şi geloză înclinată sau placă cu geloză, Aceleaşi însămînţări se fac din spută.
- Sîngele se recoltează prin tehnica hemoculturii în bulion simplu.

- Izolarea rapidă se face și prin inocularea subcutanată a sputei sau sedimentului urinar sau din bilă subcutanat la șoarecele alb.
- Se controlează macroscopic mediile însămînțate : bulionul este tulburat uniform și are un aspect viscos, siropos, datorită polizaharizilor capsulari dizolvați în mediu.

  Coloniile pe geloză sînt mari, convexe, umede, lucioase, opace cu caracter mucilaginos. Atinse cu ansa bacteriologică se desprind filamente de mucus. Frotiurile efectuate dintr-o colonie izolată colorate cu Gram și pentru capsulă arată prezența diplobacililor scurți Gram-negativ, înconjurați de o capsulă mare de 2—3 ori diametrul corpului bacilar.
- Dintr-o colonie izolată se fac subculturi în bulion și geloză înclinată pentru obținerea culturii pure.
- Se controlează animalele de laborator inoculate.
- Se controlează prin frotiu puritatea subculturilor. Se inoculează din geloza înclinată 0,5 ml suspensie de cultură în soluție clorură sodică 8,5$^{0}/_{00}$ sterilă, intraperitoneal, la șoarece.
- Din cultura de 12—16 ore în bulion se efectuează testarea sensibilității la antibiotice prin metoda difuzimetrică calitativă în agar.
- Se autopsiază șoarecele mort prin septicemie. Se reizolează în bulion și geloză, prin hemocultură din inimă tulpina în cultură pură.

  Se efectuează frotiuri prin amprente din splină, colorate cu Gram și albastru de metilen și se examinează la microscop în special la periferia frotiului, pentru prezența diplobacililor încapsulați, Gram-negativ, caracteristici.

  Se eliberează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, de patogenitate și spectrul de sensibilitate la antibiotice ale tulpinii de *Klebsiella* izolate.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU MICROBI DIN GENUL *PROTEUS*

Familia : *Enterobacteriaceae*. Genul : *Proteus*. Specia tip : *Proteus vulgaris*

Generalități

Sînt microbi larg răspîndiți în natură, unde fac parte din flora proteolitică de descompunere a substanțelor organice. Se găsește mai frecvent în flora cadavrelor, a gunoaielor, a apei de canal și în nămol. Se întîlnește sub forma de floră saprofită tranzitorie în intestinul uman și animal, unde ajunge prin intermediul alimentelor contaminate.

Specia tip este *Proteus vulgaris*, descoperit de Hansen în 1885. Microbii sînt foarte mobili, datorită prezenței cililor peritrihi și cu tendința accentuată la polimorfism. În culturile de 24—48 de ore, majoritatea microbilor au formă bacilară scurtă de 1—2 μ, alături de aceste forme

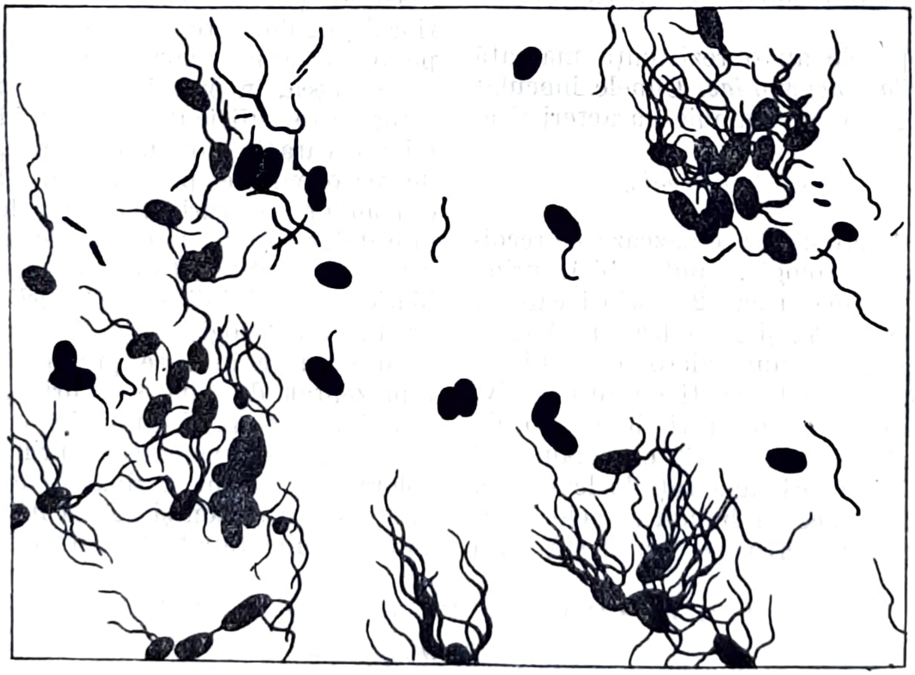


Fig. 330. — *Proteus vulgaris.* Frotiu din cultură. Colorația cililor prin metoda Zettnow.

însă apărînd şi frecvenţi cocobacili şi forme filamentoase. Microbii din genul *Proteus* se aseamănă morfologic şi tinctorial cu bacteriile din genul *Escherichia* şi *Salmonella*, fiind Gram-negativ, nesporulaţi, lipsiţi de capsulă, aerobi şi microaerofili. Diagnosticul diferenţial cu celelalte enterobacterii se efectuează prin stabilirea caracteristicilor biochimice şi prin faptul că tulpinile mobile de *Proteus* cresc cu repeziciune pe suprafaţa unei plăci cu geloză, determinînd fenomenul caracteristic de ,,invazie a mediului'' în interval de maximum 24 de ore. Există însă şi unele tulpini de *Proteus* care nu prezintă fenomenul de invazie. Acestea reprezintă variante imobile de *Proteus*. Tulpinile de *Proteus* sînt insensibile la antibioticele uzuale, ca : penicilina, streptomicina şi tetraciclinele. Prezintă o sensibilitate moderată faţă de cloramfenicol şi kanamicină.

Patogenitatea pentru om se manifestă prin determinarea unor procese supurative, singur sau în asociaţie cu alţi microbi. Se cunosc infecţii purulente ca abcese, infecţii urinare, cistite, pielite, precum şi cazuri de enterită infantilă şi intoxicaţii alimentare. Dintre speciile de *Proteus*, *P. morganii* are acţiunea patogenă cea mai pronunţată. *Proteus morganii* prezintă o patogenitate moderată pentru animalele de laborator, la care, injectat subcutanat în cantitate mare, determină abcese. Celelalte specii de *Proteus* nu sînt patogene pentru animalele de laborator.

Weil şi Felix au studiat *Proteus vulgaris* şi au introdus termenii de *H* (Hauch = peliculă) şi *O* (ohne Hauch = fără peliculă), pentru a indica formele mobile şi imobile. De atunci *H* a devenit sinonim cu antigen flagelar şi *O* cu antigen somatic. Aceste litere sînt folosite şi pentru a desemna tipurile de aglutinare, aglutinarea *H* referindu-se la aglutinarea bacteriilor în aglomerate mari, moi şi pufoase, semănînd cu fulgi de zăpadă, iar aglutinarea *O*, la aglutinarea fină, granulară, asemănătoare cu grindina. Antigenele *H* sînt comune tuturor speciilor de *Proteus*. Antigenele *O* posedă specificitate de specie.

În 1916, Weil şi Felix au izolat tulpini de *Proteus vulgaris* de la bolnavi de tifos exantematic şi au găsit că serurile lor aglutinează cu tulpinile de *Proteus* OX_{19} sau OX_2. Deoarece antigenul specific *O*, cu care reacţionează, este localizat în corpul bacilului, tulpinile imobile OX_{19} şi OX_2 sînt folosite în general ca antigene aglutinante. Proteul însă nu este agentul patogen al tifosului exantematic ; el posedă numai fracţiuni antigenice comune cu *Rickettsia prowazecki*, agentul etiologic al tifosului exantematic. Pe baza acestor fapte, Weil şi Felix au iniţiat reacţia serologică de diagnostic care le poartă numele, pentru evidenţierea tifosului exantematic.

În serul bolnavilor de tifos exantematic apar, începînd din a 7-a — a 10-a zi de boală, anticorpi aglutinanţi care aglutinează o suspensie vie sau omorîtă de *Proteus* OX_{19}, în titruri ridicate pînă la 1/10 000.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul de laborator al infecţiilor cu *Proteus* se bazează pe recoltarea produsului patologic şi izolarea agentului etiologic pe medii uzuale solide şi lichide, subculturi pe medii speciale Istrate-Meitert sau *S S* şi pe studiul caracterelor biochimice.

Din puroi, materii fecale sau alimente contaminate se fac suspensii în 2 — 3 ml soluţie clorurosodică $8{,}5^0/_{00}$ sterilă şi se însămînţează cu ansa în bulion, pe geloză înclinată şi pe un mediu selectiv, Istrate-Meitert sau *Salmonella-Shigella*. Pe mediul Istrate-Meitert creşte sub formă de colonii caracteristice, cu centrul opac, colorat intens în verde şi periferia transparentă-verzuie. Pe mediul *S S* (*Salmonella-Shigella*) creşte sub forma de colonii cu centrul opac, de culoare brună şi periferia decolorată. Pe mediile speciale nu se manifestă fenomenul de invazie a mediului, microbii fiind parţial inhibaţi de sărurile biliare.

Urina se centrifughează în prealabil şi din sediment se fac însămînţările pe medii uzuale şi selective.

Culturile pe mediile uzuale se controlează prin examen direct între lamă şi lamelă şi frotiu pentru prezenţa microbilor de formă bacilară pleomorfi, mobili, Gram-negativ. Subculturile în bulion şi geloză pentru izolarea în cultură pură se fac însă din coloniile izolate caracteristice de pe mediile selective. Din cultura pură se va efectua fenomenul de invazie pe o placă cu geloză simplă şi se va testa hemoliza pe geloză-sînge şi efectul proteolitic prin însămînţare în gelatină şi ser coagulat care se lichefiază în interval de 18 — 24 de ore. Din cultura în bulion se va efectua testarea sensibilităţii la antibiotice prin metoda difuzimetrică calitativă în agar.

Pentru completarea diagnosticului şi diferenţierea speciilor în interiorul genului *Proteus*

TABELUL 116

Spectrul de fermentare a carbohidraţilor şi reacţiile biochimice de diferenţiere a varietăţilor de *Proteus*

Carbohidraţi	*Proteus vulgaris*	*Proteus mirabilis*	*Proteus morganii*	*Proteus rettgerii*
Maltoză	+	—	—	—
Manită	—	—	—	+
Xiloză	+	+	—	—
Adonită	—	—	—	+
Salicină	+	L	—	V
Inozită	—	—	—	+
Indol	+	—	+	+
H_2S	+	+	+	—
Gelatină	+	+	—	—
Citrat	V	V	—	+
Voges-Proskauer	—	V	—	—
Roşu-metil	+	+	+	V
Uree	+	+	+	+

Legendă : + = fermentare ;
L = fermentare lentă ;
V = variabil.

se folosesc determinarea spectrului de fermentaţie a carbohidraţilor şi alte teste biochimice.

Proteus vulgaris descompune ureea, lichefiază gelatina şi produce H_2S în mediile cu subacetat de plumb. Nu fermentează lactoza, dar fermentează, cu producere de acid şi gaz glucoza, maltoza, glicerolul, zaharoza şi salicina. Tulpinile de *Proteus* care fermentează maltoza produc şi indol din peptonă.

Fermetarea carbohidraţilor se poate asocia cu acţiunea reductoare asupra roşului neutru. Acţiunea reductoare se manifestă şi asupra nitraţilor, pe care îi reduce în nitriţi şi asupra albastrului de metilen, pe care îl decolorează lent. Reacţia roşului de metil este pozitivă, iar Voges-Proskauer negativă. Unele tulpini au o acţiune hemolitică asupra hematiilor umane şi de iepure, hemolizinele sînt termolabile şi sînt distruse prin încălzire la 65°.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU *PROTEUS*

Schema de diagnostic

Produse patologice : exsudat purulent, materii fecale, urină, alimente

— Datorită răspîndirii ubicuitare ca saprofit şi asemănării morfologice cu enterobacteriaceele, examenele directe nu se recomandă decît pentru alimentele suspecte, unde prezenţa în număr mare poate constitui un indiciu de contaminare masivă.

— Puroiul, materiile fecale şi proba de aliment se suspendă în 2—3 ml ser fiziologic steril, şi se fac însămînţări cu ansa în bulion, pe geloză înclinată şi pe Istrate-Meitert.

— Urina se centrifughează în prealabil, iar sedimentul este însămînţat în bulion, pe geloză înclinată şi pe Istrate-Meitert.

— Se controlează macroscopic mediile însămînţate : bulionul se tulbură şi suprafaţa gelozei este invadată. Pe Istrate-Meitert apar colonii caracteristice, lactozonegative cu centrul opac, de culoare verde închis şi cu periferia verde deschis (ochi de pisică). Examenul direct între lamă şi lamelă şi prin frotiu colorat Gram evidenţiază prezenţa microbilor mobili de formă bacilară, gram-negativi cu pleomorfism accentuat. Dintr-o colonie izolată caracteristică se efectuează subculturi în bulion şi geloză înclinată.

— Se controlează subculturile prin frotiu pentru puritate şi se efectuează însămînţările pentru diferenţierea tulpinii de celelalte enterobacteriacee şi în speciile înrudite de proteus.

↓ Testul hemolizei pe geloză sînge.

↓ Fenomenul de invazie pe o placă cu geloză simplă.

↓ Testul proteolizei pe gelatină şi ser coagulat.

↓ Spectrul de sensibilitate la antibiotice prin metoda difuzimetrică în agar.

↓ Spectrul de fermentare al carbohidraţilor şi testele biochimice de diferenţiere a speciilor de *Proteus*.

Se eliberează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, biochimice, şi spectrul de sensibilitate la antibiotice ale tulpinii de *Proteus*, izolate.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU PIOCIANIC

Familia : *Pseudomonadaceae*. Genul : *Pseudomonas*. Specia tip : *Pseudomonas pyocianea*

Generalităţi

Este un microb saprofit ubicuitar, răspîndit în apă şi sol. În infecţiile umane poate fi microb de asociaţie, dînd coloraţia albastră-verzuie a puroiului din plăgi şi a secreţiilor purulente, fapt pentru care a fost denumit *pyocianeus* = puroi-albastru. Microb în formă de bacil subţire, de 2 — 4 μ lungime, pleomorf, mobil cu un cil la unul din capete, nesporulat, necapsulat, Gram-negativ, aerob şi microaerofil. Deşi lipsit de spori, rezistă bine la factorii de mediu şi la majoritatea antibioticelor uzuale. Este sensibil la neomicină şi polimixină. Creşte pe mediile obişnuite de cultură la temperaturi între 22 şi 37°. Pe agar creşte abundent, cu formarea caracteristică de pigment fluorescent de culoare albastră-verzuie, care colorează mediul. În bulion creşte la fel de abundent formînd o membrană groasă la suprafaţă, sub care se adună pigmentul în formă de inel. În cîteva zile culoarea pigmentului virează spre brun închis. Din bacilul piocianic se pot extrage 2 pigmenţi diferiţi, piocianina cloroformosolubilă şi fluoresceina, solubilă în apă, dar insolubilă în cloroform. Unul din fermenţii bacilului piocianic — piocianaza — are acţiune antibiotică marcată faţă de cocii Gram-pozitiv şi negativ şi faţă de unii bacili, ca *B. anthracis* şi *C. diphtheriae*.

La om, în afară de faptul că produce complicaţia plăgilor, poate determina infecţii urinare, otite, meningite şi pleurezii purulente la adulţii cu rezistenţă scăzută, iar la copiii distrofici poate da infecţii intestinale, enterite cu piocianic. Septicemia cu piocianic a sugarului este cea mai gravă localizare, care, după o evoluţie de cîteva zile, se termină cu moartea. În ultimii ani se semnalează din ce în ce mai frecvent infecţii intraspitaliceşti.

Diagnosticul de laborator

Prezenţa pigmentului albastru-verzui caracteristic, pe care microbul îl elaborează în produsul patologic, reprezintă un indiciu preţios de diagnostic. Produsele patologice reprezentate de exsudatele purulente ale plăgilor, urina, lichidul cefalorahidian sau conţinutul intestinal sînt recoltate în recipiente sterile şi însămînţate pe medii uzuale, geloză înclinată şi bulion. Puroiul şi materiile fecale se suspendă în prealabil în soluţie cloruro sodică 8,5$^{0}/_{00}$ steril, şi apoi se efectuează însămînţări prin tehnica epuizării ansei. Urina şi lichidul cefalorahidian se centrifughează în cîte 2 tuburi de centrifugă sterile, iar din sediment se efectuează frotiuri directe şi însămînţări pe geloză şi în bulion. Însămînţările efectuate în bulion indică dezvoltarea microbului prin apariţia unei turbidităţi după cîteva ore care se însoţeşte de formarea la suprafaţă a unei pelicule de culoare cenuşie-murdară, aderentă de peretele tubului de cultură. După 24 de ore bulionul devine filant, vîscos, sub peliculă se adună pigmentul albastru-verzui şi se degajă un miros aromatic caracteristic, asemănător florii de accacia, care se datoreşte elaborării unui metabolit intermediar, trimetilamina.

Pe geloză coloniile de piocianic apar după 24 de ore, au o formă rotundă, convexă, lucioasă, cu reflexe fluorescente, de culoare verzuie, care pigmentează mediul şi virează spre verde-brun în culturile vechi. Pe ser coagulat se dezvoltă rapid sub forma de colonii care lichefiază şi pigmentează mediul. Din coloniile izolate se execută un frotiu care se colorează cu Gram şi care indică prezenţa unor forme bacilare Gram-negativ cu polimorfism accentuat. Un examen direct între lamă şi lamelă indică prezenţa formelor bacilare mobile. Mobilitatea poate fi pusă în evidenţă şi prin însămînţare pe mediul Tittsler-Sandholzer.

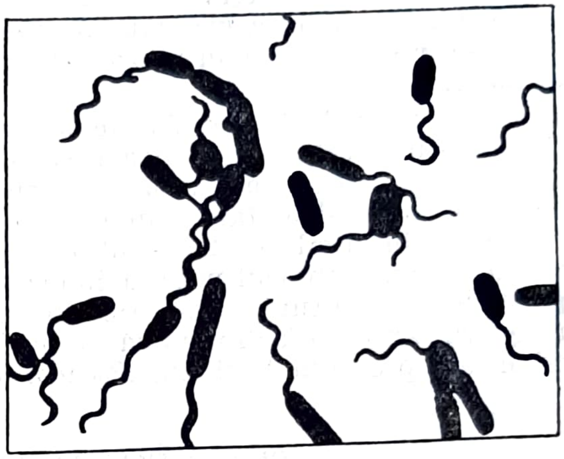


Fig. 331. — Pseudomonas pyocianea. Coloraţie pentru cili (Zettnow × 300).

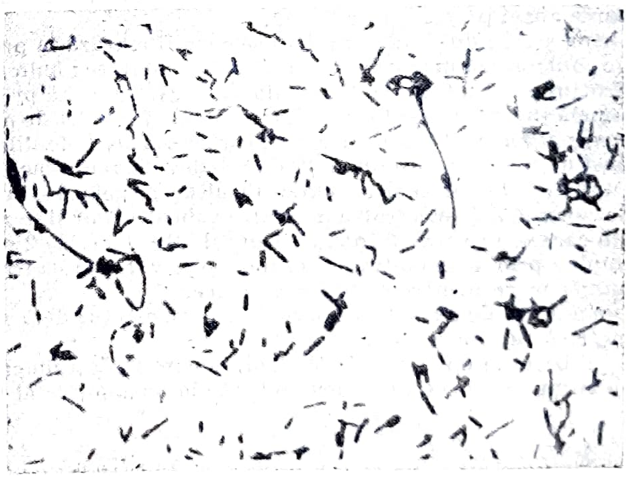


Fig. 332. — Pseudomonas pyocianea. Frotiu din cultură în bulion.

Din culturile pe geloză se alege o colonie izolată caracteristică şi se efectuează subcultură în bulion pentru testarea sensibilității la antibiotice și pentru testul de patogenitate la șoarece sau cobai.

Testul de patogenitate se poate efectua inoculînd 0,5 ml cultură intraperitoneal la un cobai mascul care, în interval de 2 — 3 zile, face o infecție purulentă a vaginalei testiculare. În puroi se regăsesc bacilii *Pseudomonas* în număr mare.

Cea mai convenabilă metodă de a conferi infecția experimentală este inocularea subcutanată sau intraperitoneală a 0,5 ml cultură la 2 șoareci. Animalele fac o infecție de tip septicemic în interval de 24 — 48 de ore și putem izola prin hemocultură din inimă bacilul piocianic în cultură pură. De asemenea, frotiurile prin amprentă din splină ne îngăduie să evidențiem prezența bacilului *Pseudomonas*. Există variante de *Pseudomonas* care dezvoltă pigment roșu, pigment negru sau sînt acromogene, care însă nu interesează patologia umană, ci sînt saprofiți accidentali, care au contaminat produsul patologic. Uneori, o tulpină de *Pseudomonas* proaspăt izolată, nu dezvoltă pigmentul decît cu întîrziere ; de obicei, pentru a favoriza apariția pigmentului după 24 de ore de păstrare la termostat, se lasă la temperatura camerei încă 24 — 48 de ore, după care interval pigmentația caracteristică apare. Se mai poate face și o trecere a tulpinii izolate pe mediul Gessard (geloză glicerinată 10%) care stimulează apariția piocianinei.

Bacilul piocianic poate fi diferențiat de bacilii fluorescenți saprofiți din sol și apele poluate, prin faptul că bacilii fluorescenți nu secretă piocianină, ci numai fluoresceină.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE CU PIOCIANIC

Schema de diagnostic

Produse patologice : exsudat purulent, urină, materii fecale, lichid cefalorahidian

- Examenul macroscopic al puroiului poate să constituie un prim indiciu, datorită elaborării pigmentului caracteristic albastru-verzui.
- Datorită răspîndirii ubicuitare ca saprofit ; examenul microscopic direct nu ne poate da nici măcar indicații de orientare.
- Puroiul și materiile fecale se suspendă în 2—3 ml soluție clorurosodică 8,5‰ sterilă și se însămînțează în bulion și prin epuizarea ansei pe geloză înclinată.
- Urina și lichidul cefalorahidian se centrifughează în prealabil, iar sedimentul este însămînțat în bulion și geloză înclinată.
- Se controlează macroscopic mediile însămînțate : bulionul se tulbură repede și formează o peliculă groasă aderentă de tub. Frotiul efectuat din bulion colorat cu Gram arată prezența unor bacili pleomorfi Gram-negativ. Examenul între lamă și lamelă indică prezența unui bacil mobil. După 24 de ore bulionul degajă un miros aromatic caracteristic și sub peliculă apare pigmentul albastru-verzui caracteristic. Coloniile pe geloză sînt rotunde, convexe, lucioase, verzui și pigmentează mediul în verde care după 48 de ore devine verde-închis, brun.
- Din coloniile izolate se execută subculturi pe geloză și în bulion pentru obținerea tulpinii în cultură pură.
- Se controlează prin frotiu puritatea subculturilor și se efectuează un inocul de cultură în soluție clorurosodică 8,5‰ sterilă din care se injectează intraperitoneal cîte 0,5 ml la 2 șoareci albi. Șoarecii mor prin septicemie, iar la autopsie se va reizola tulpina prin hemocultură din inimă și se vor efectua frotiuri din splină care vor evidenția prezența bacililor Gram-negativ în număr mare printre celulele splenice.
- Din cultura de 12—16 ore în bulion se va efectua determinarea spectrului de sensibilitate la antibiotice prin metoda difuzimetrică în agar.

Se eliberează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, pigmentogeneza, patogenitatea pe animal și spectrul de sensibilitate la antibiotice al tulpinii.

BIBLIOGRAFIE

BERCOVICI C., CAHAN A., OVĂNESCU A., DIMITRIU N., CÎRDEI J., BALTIEV A., CORBER S., BEȘLEAGĂ V. — Tulburări acute de nutriție la sugari cu germeni din grupul *Escherichia*, Cercetări bacteriologice, *Microbiologia* (*București*), 1958, nr. 3, p. 227—234.

CHERNOVA V. N. — Posibilitatea de a folosi reacția de hemaglutinare pentru diagnosticul colienteritelor la copii, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1960, nr. 11, p. 74—78.

DAVIDOV V. P. — Caracteristicile serologice ale *B. coli* izolat de la copii mici suferind de afecțiuni gastrointestinale, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1958, nr. 1, p. 56—60.

DUMAS J. — Bactériologie médicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 373—385 ; 386—394 ; 395—400 ; 469—475.

ELȘINA M. A., MOLCENKO E. F. — Anumite date asupra rolului etiologic al *E. coli* de serotip $O_{11}BA$ în afecțiunile intestinale acute ale copiilor, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1959, nr. 4, p. 44—49.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 394—406 ; 407—409 ; 410—417 ; 417—426 ; 567—572.

GOLD E. — Reacţia Dubos-Middlebrook la *Escherichia coli*, *Microbioloiga* (*Bucureşti*), 1957, nr. 2, p. 129—131.

GUSARSKAIA I. L., PIK-LEVONTIN E. M., KOMAHINA L. D., PETROVSKAIA Z. N. — Caracterizarea clinicobacteriologică a enteritelor cu *E. coli* la copii, *Sovetsk. Med.*, 1960, nr. 11, din *Probleme de patologie infecţioasă din literatura sovietică de specialitate*, 1961, nr. 3, p. 194—202.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 171—193.

IOAN ELENA, OANĂ C., BOTAN A., APRIHĂNEANU D., IORDĂCHESCU D. — Precizarea diagnosticului de tifos exantematic şi evaluarea potenţialului epidemiologic cu ajutorul laboratorului, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1959, nr. 1, p. 31—40.

IZRALIMSKI A. S., SMIRNOVA T. V., KRILOVA V. P., LEVINSON-GOFMAN V. O. — Izolarea tipurilor serologice patogene de *B. coli* la copii, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1958, nr. 2, p. 110.

IVANOF A., CIUPE M., IONESCU N., NEGRU MAGDALENA — Cercetări privind durata stării de purtător de *Escherichia coli*, O_{111} B_4 şi O_{55} B_5, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1961, nr. 4,p. 347—350.

KOLMER J., BOERNER F. — Approved Laboratory Technic, ed. a 4-a, Ed. Appleton-Century, New York, 1945, p. 455 ; 455—457 ; 467—469 ; 470.

KUDLAI D. G., PIETROVSKAIA V. G. — Asupra proprietăţilor antigenice specifice ale bacteriilor intestinale, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1957, nr. 8, p. 16—22.

LEPP F. Ya., TALLMEISTER E. T. — Unele proprietăţi ale *E. coli* (tipuri serologice O_{26} şi O_{111}) izolate în diareea sugarilor şi copiilor, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1959, nr. 12, p. 73—77.

MACKIE T. J., MC CARTNEY J. E. — Handbook of practical Bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 351—353, 426—434.

MEITERT T. — Bacteriologie medicală, sub. red. prof. Nestorescu N. şi colab., Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 510—516.

MINKEVICI E. I. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, sub red. Sinai G. I. şi Birgher O. G. (traducere din limba rusă), Ed. de stat pentru literatura ştiinţifică, Bucureşti, 1952, p. 346—362.

MORGAN R. H., CHEEVER F. S. — Bacterial and Mycotic Infections of Man, sub red. Dubos R., ed. a 2-a, Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 410—417.

NESTORESCU N., POPOVICI MARCELA — Bacteriologie medicală, sub red. prof. Nestorescu N., Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 424—434 ; 486—489 ; 491—497.

ROGERS K. B., TAYLOR JOAN — Laboratory diagnosis of gastroenteritis due to *Escherichia coli*, *Bull. O.M.S.*, 1954, nr. 24, p. 59—72.

SINAI G. I. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, sub red. Sinai G. I. şi Birgher O. G. (traducere din limba rusă), Editura de stat pentru literatura ştiinţifică, Bucureşti, 1952, p. 213 ; 262—264.

STITT E. R., CLOUGH P. W., BRANHAM S. E. — Practical Bacteriology, Hematology and Parasitology, ed. a 10-a, Ed. Blakiston, New York, 1948, p. 122—123 ; 138—140 ; 140—141 ; 145—146.

THOMPSON R. V. — Microbiology and Epidemiology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Philadelphia, 1958, p. 36, 352—353, 427, 429—430.

TOPLEY and WILSON'S — Principles of bacteriology and immunity, ed. a 4-a, Ed. Edward Arnold, 1955, vol. I, p. 595—603 ; 751—764 şi 764—772 ; 737—748 ; 772—776 ; vol. II, p. 1 779—1 790.

WHITBY L., HYNES M. — Medical Bacteriology, ed. a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 178—189.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, partea I, p. 405—427 ; 434—439 ; 462—470 ; 474—478.

ZINSSER H. — Textbook of bacteriology, ed. a 11-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New York, 1957, p. 408—411 ; 414—419 ; 419—420 ; 425—427.

ZIKIN I. E. — Asupra microbiologiei *Klebsiella Pneumoniae Friedländer*, *Ž. Mikrobiol. Mosk.*, 1959, nr. 9, p. 61—65.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU *SALMONELLA*

Familia: ***Enterobacteriaceae***. Genul: ***Salmonella***. Specia tip: ***Salmonella** typhi* sau ***Eberthella typhosa***

Generalităţi

Genul *Salmonella* cuprinde bacterii care au următoarele caractere comune: bacili subţiri, scurţi sau lungi, gram-negativi, majoritatea mobili, aerobi, care cresc pe medii uzuale, nu lichefiază gelatina, nu fermentează lactoza, nu produc indol şi fermentează obişnuit glucoza. Aceste bacterii, strîns înrudite între ele, se pot diferenţia numai pe baza structurii antigenice legate de prezenţa antigenelor somatice *O* şi a antigenelor flagelare *H* mono- şi difazice. La *S. typhi* şi *S. paratyphi C* există, în plus, antigenul de înveliş *Vi*. Se cunosc pînă în prezent 377 de tipuri serologice de salmonele şi mereu se descoperă alte tipuri noi. Din acest număr mare de salmonele patogene, cel mai frecvent întîlnite în ţara noastră sînt: *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C*, *S. typhi murium*, *S. enteritidis Gärtner* şi *S. choleraesuis*.

Toate tulpinile genului *Salmonella* sînt patogene pentru om şi animale.

La om, infecţiile produse de salmonele se manifestă variat din punct de vedere al patogeniei şi simptomelor clinice. Unele salmonele determină infecţii de tip septicemic, ca *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* şi *S. choleraesuis*, varietatea Kunzendorf. Altele determină toxiinfecţii alimentare, care se pot manifesta fie sub forma infecţioasă, asemănătoare febrelor tifoparatifice, dar de scurtă durată, fie sub forma toxienterică, în care procesul se petrece aparent numai la nivelul intestinului.

Toate salmonelele, indiferent de forma de manifestare clinică, au un tropism marcat pentru sistemul limfatic intestinal, asupra căruia acţionează prin intermediul endotoxinelor microbiene.

Ele provoacă, din partea organismului uman reacţii sanguine caracteristice, care în loc de a fi de tip fibrino-leucocitar, ca în infecţiile cu microbi piogeni, se manifestă prin leucopenie cu mononucleoză.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL FEBREI TIFOIDE ŞI FEBRELOR PARATIFOIDE

Salmonella typhi este un microb specific infecţiei umane şi metodele de diagnostic folosite sînt în concordanţă cu patogenia infecţiei tifice.

Calea de pătrundere a bacilului tific este tubul digestiv. Pătrunzînd prin mucoasa esofagiană şi în special intestinală, microbii pătrund în ganglionii limfatici, mediastinali şi mezenterici, trec în limfatice şi prin canalul toracic direct în sînge, determinînd prima bacteriemie. Din sînge trec în organe, unde se înmulţesc activ, se localizează şi formează focare secundare în ficat, splină şi măduva oaselor. Ulterior, din aceste focare se revarsă din nou în sînge, determinînd a doua bacteriemie, care coincide cu apariţia simptomelor clinice de boală şi reinvazia intestinului.

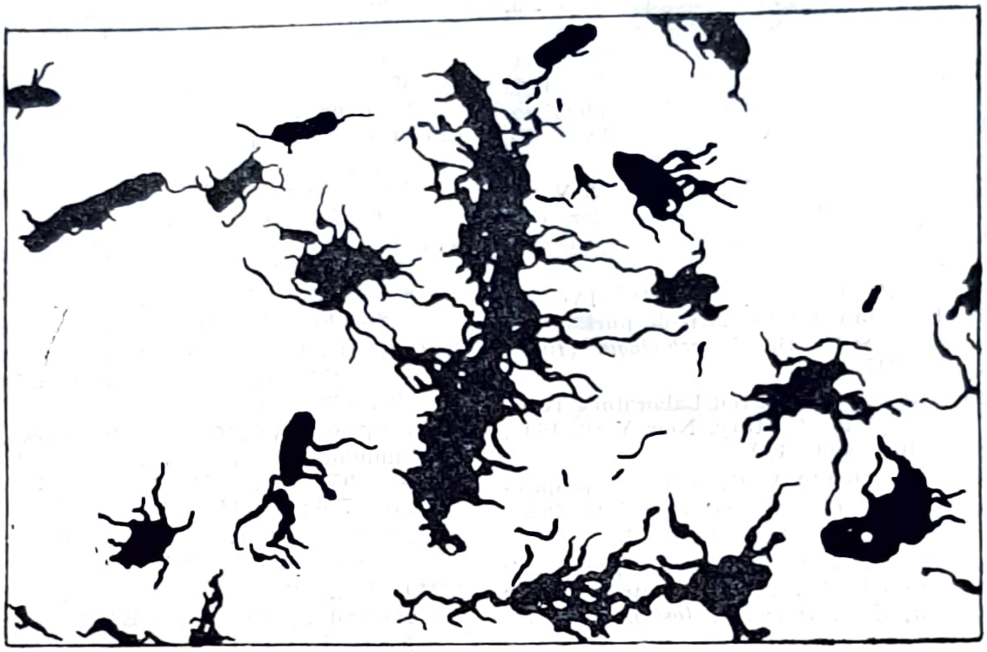


Fig. 333. — *Salmonella typhi*. Cultură în bulion. Coloraţia cililor prin metoda Zettnow.

Localizarea bacililor tifici pe intestin este urmată de apariţia leziunilor intestinale la nivelul plăcilor Peyer şi al foliculilor solitari, reprezentate de hiperplazie, necroză şi escară. Datorită acestui mecanism patogenic, prezenţa microbilor în sînge, intestin şi urină este condiţionată de perioadele evolutive ale bolii.

Ţinînd seama de datele referitoare la circuitul bacililor tifici în organismul bolnavului, ca şi de dinamica anticorpilor specifici, Topley şi Wilson au stabilit raporturile între evoluţia bolii şi posibilităţile diagnosticului de laborator. Rezultă, din constatările autorilor de mai sus, că la începutul bolii, în primul septenar hemocultura este pozitivă în 90 — 95% din cazuri, iar coprocultura în numai 20% din cazuri, iar anticorpii din ser lipsesc cu desăvîrşire sau sînt prezenţi în titruri scăzute. Pe măsură ce boala evoluează, procentul hemoculturilor scade treptat și crește cel al coproculturilor pozitive, pînă la sfîrșitul celei de-a patra săptămîni de boală. Titrul anticorpilor aglutinanți crește mereu și rămîne ridicat și după vindecare.

În timpul convalescenței și pe măsură ce se organizează procese inflamatoare cronice specifice la nivelul mucoaselor veziculei biliare, al canalelor intrahepatice și uneori, la nivelul rinichiului, *S. typhi* poate persista în fecalele și urina foștilor bolnavi de febră tifoidă, constituind așa-numiții purtători de microbi.

La purtătorii de microbi, în eventualitatea cantonării bacililor tifici într-un țesut sau organ, fără posibilitate de a fi eliminați la exterior, se constituie o stare de microbism latent, care poate determina apariția unor complicații tardive, posttifice, de obicei cu caracter localizat ca abcese, flegmoane, osteoperiostite etc.

La alți purtători de microbi, bacilii tifici se localizează în organe și țesuturi, care au cale de acces spre exterior, mai ales în veziculă și căile biliare și sînt astfel excretate prin fecale și urină în mediul înconjurător. Purtătorii de bacili tifici excretori joacă un mare rol în izbucnirea epidemiilor de febră tifoidă și în menținerea endemiei tifice. Datorită, pe de o parte, faptului că unii purtători pot elimina bacili tot restul vieții — purtătorii cronici — iar pe de altă parte, că excretarea microbilor se manifestă cu caracter intermitent, decelarea, diagnosticul și tratarea lor este legată încă de unele greutăți.

Diagnosticul de laborator în febra tifoidă și febrele paratifoidice se folosește în precizarea diagnosticului clinic la omul bolnav, la depistarea și identificarea purtătorilor de microbi și pentru izolarea microbului, *post mortem*, de la cadavru.

Metodele diagnosticului de laborator sînt multiple și ele se aplică în funcție de etapa evolutivă a bolii. Metodele diagnosticului bacteriologic se bazează pe izolarea din sînge, urină, bilă și fecale a microbului, și identificarea lui. Metodele diagnosticului serologic se bazează pe evidențierea în serul bolnavului a prezenței anticorpilor specifici și a creșterii dinamice a titrului lor. Metoda lizotipiei bacteriofagice se aplică la bolnav și purtătorul de microbi, în completarea diagnosticului bacteriologic, în cazul unor investigații epidemiologice.

Diagnosticul bacteriologic

Decelarea microbilor în sînge este posibilă din primele zile de boală în 90 — 95% din cazuri. Șansele de izolare din sînge scad treptat și ajung sub 30% în cea de-a patra săptămînă de boală.

Din materiile fecale se poate izola microbul din a patra zi de boală; cele mai mari cifre de rezultate pozitive se constată însă în a treia săptămînă de boală (80 — 90%).

Din urină, bacilii pot fi izolați în aproximativ 30% din cazuri către sfîrșitul celei de-a treia săptămîni de boală.

Cercetarea *S. typhi* trebuie urmărită și repetată cu insistență în cazul rezultatelor negative, deoarece izolarea și identificarea bacilului constituie singurul mijloc cert de diagnostic etiologic.

Hemocultura este metoda cea mai utilizată de izolare și se face, obișnuit, din vena plicii cotului.

Hemocultura din artere (arteriocultura) este folosită în cazuri excepționale și se practică din artera femurală.

Hemocultura se poate executa, fie cu o seringă Luer cu acul montat și sterilizată la 180°, fie folosind direct acul montat la balonul cu mediu.

Hemocultura se execută de preferință în medii lichide, în cazul salmonelelor, în bulion simplu.

Se extrag circa 5 — 10 ml sînge prin puncție venoasă, cu riguroase precauții de antisepsie a pielii. De obicei, raportul între volumul de sînge recoltat și volumul mediului în care se practică hemocultura trebuie să fie 1/10. În perioadele mai avansate de boală cantitatea de sînge necesară este mai crescută, 15 — 20 ml, deoarece șansele de izolare a bacililor scad treptat după prima săptămînă de boală. În cazul folosirii tehnicii de recoltare cu acul montat la balon, volumul de sînge necesar se apreciază prin numărarea picăturilor care se scurg în mediu prin tubul de sticlă.

După recoltarea sîngelui, se îndepărtează acul cu montura lui și se trage de tubul de cauciuc cu o mînă, în timp ce cu cealaltă presăm dopul de vată, pentru a asigura astuparea vasului și a împiedica contaminarea mediului. Vasul cu sînge și bulion se etichetează și se așază la termostatul de 37°. Sîngele recoltat cu seringa se însămînțează pe loc la flacără, într-un balon cu mediu.

Este de preferat să folosim prima tehnică, deoarece evită mai mult posibilitățile de contaminare a mediului, o dată cu introducerea sîngelui. Controlul dezvoltării microbilor în hemocultură se face zilnic observînd :

a) macroscopic : prezența unei turbidități a mediului de cultură, care indică dezvoltarea microbilor ;

b) microscopic : prin preparat proaspăt între lamă și lamelă, care se observă la microscop cu obiectiv 7 ; în cazul salmonelelor, se decelează bacili mobili, în cîmpul microscopic. Testarea mobilității se poate face în condiții mai bune folosind mediul Tittsler-Sandolzer cu manită și roșu de fenol. Mediul este însămînțat prin înțepare cu ansa încărcată cu o picătură din bulionul de hemocultură. Dacă microbul este mobil, cultura difuzează de o parte și de alta a liniei de însămînțare și tulbură mediul. Dacă microbul însămînțat este *Salmonella typhi*, fermentează manita și mediul virează de la roșu la galben. Se execută și un frotiu colorat cu Gram, care evidențiază prezența unor bacili Gram-negativ ;

c) prin subcultură : se însămînțează zilnic, pe geloză înclinată, pînă la apariția creșterii microbiene, cîteva picături din hemocultură. O hemocultură nu poate fi considerată negativă decît după 14 zile de incubare la termostat și după ce a fost controlată zilnic macroscopic, microscopic și prin subcultură.

În cazul unei hemoculturi pozitive, după 24 de ore de incubație la 37° a transplantului pe geloză înclinată, se execută controlul acestuia, pe baza caracterelor morfotinctoriale prin mobilitate și frotiu, care trebuie să confirme prezența bacililor mobili, Gram-negativ. În continuare, se cercetează caracterele de cultură și biochimice necesare pentru completarea diagnosticului bacteriologic de specie și tulpină.

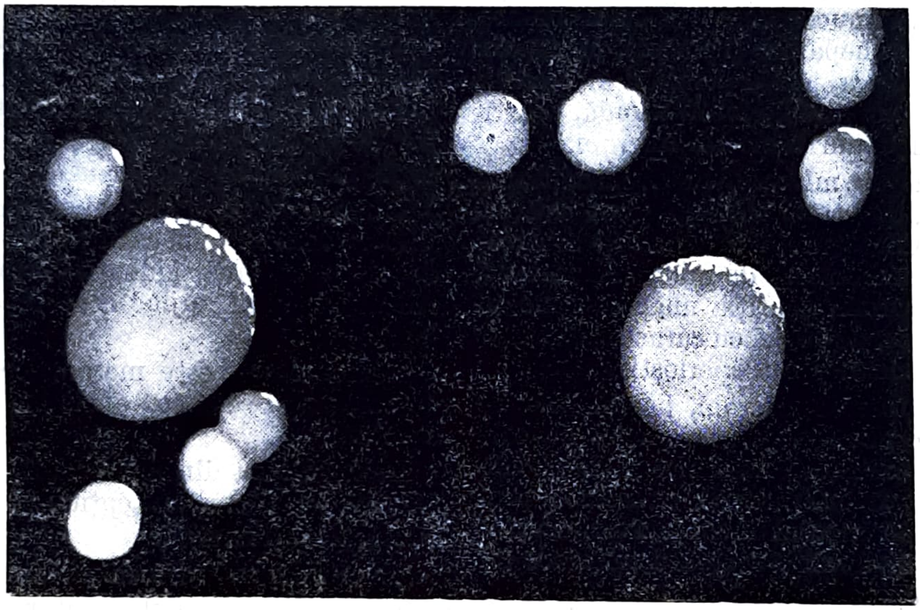


Fig 334. — S. typhi. Colonii *S* și *R* pe geloză.

Pentru cercetarea caracterelor de cultură, tulpina de cercetat se însămînțează pe medii selective și diferențiale : Wilson-Blair, Shigella-Salmonella Vogelsang, Kristensen-Kauffmann, Istrate-Meitert, Hajna sau Drigalski. O dată cu stabilirea caracteristicilor de cultură se face și diferențierea de alte enterobacterii înrudite.

Pe mediul Wilson-Blair, culturile de salmonele au un aspect caracteristic și cresc sub forma unor colonii plate, de culoare neagră, cu luciu metalic și cu halou verzui în jur, sau sub forma unor colonii mici pulverulente, de culoare verde închis. Celelalte enterobacterii sînt inhibate și nu se dezvoltă pe acest mediu foarte selectiv.

Pe mediul Vogelsang, coloniile de salmonele virează mediul în albastru prin fermentarea zaharozei. Coloniile de colibacili virează mediul în galben, datorită fermentării lactozei din mediu.

Pe mediul Istrate-Meitert, foarte utilizat în țara noastră, salmonelele dau colonii mici, transparente, de culoare verzuie. Colibacilul parțial inhibat dă colonii galbene, datorită fermentării lactozei. Bacilul proteu crește sub forma de colonii verzui, cu centrul verde închis caracteristic. Pe mediul Drigalski, care evidențiază fermentarea lactozei, coloniile de salmonele sînt incolore, transparente, lactozonegative.

Pentru studiul caracterelor biochimice diferențiale cu salmonelele înrudite, se folosește mediul Hajna, al cărui principiu de diagnostic, se bazează pe proprietatea salmonelelor de a fermenta glucoza exclusiv în anaerobioză. Această fermentare este evidențiată de virajul în galben al indicatorului roșu de fenol.

Însămînțarea se face atît în profunzimea coloanei, prin înțepare, cît și pe suprafața mediului. Coloana va fi virată de microbii care fermentează glucoza; fermentarea glucozei cu producere de gaz, se evidențiază prin dislocarea coloanei, iar producerea de H_2S apare după 48 de ore, prin înnegrirea mediului.

B. tific virează coloana fără dislocare și înnegrește mediul.

B. paratific A virează coloana, cu dislocare și fără înnegrire.

B. paratific B virează coloana, cu dislocare și înnegrire.

Aceste caractere biochimice sînt, în general, suficiente pentru caracterizarea grupului tifoparatific. Pentru un studiu complet, se mai adaugă cercetarea fermentării zaharozei, salicinei, manitei, adonitei etc., cercetarea producerii de indol, a producerii de urează și comportarea față de KCN sau testul Braun și lichefierea gelatinei. Tulpina de cercetat, astfel caracterizată din punctul de vedere al caracterelor morfologice, de cultură și biochimice, este o salmonelă și după toate probabilitățile, *S. typhi*. Identificarea definitivă se face prin diagnostic pe baza structurii antigenice.

Tehnica identificării serologice a salmonelelor. Se aplică oricărei tulpini de *Salmonella*, indiferent de produsul patologic din care a fost obținută. Se utilizează în acest scop schema structurii antigenice a salmonelelor, după Kauffmann și White, în care este indicată, pentru fiecare specie, formula antigenică bazată pe fracțiunile somatice O și fracțiunile antigenice H, în faza I specifică și în faza a II-a nespecifică. La *S. typhi* și *S. paratyphi* C se adaugă și antigenul de înveliș Vi.

Serurile aglutinante anti-*Salmonella* se prepară prin imunizarea iepurilor cu antigenele specifice ale salmonelelor. Serurile pot fi întrebuințate, fie în reacția de aglutinare pe lamă, la diluția indicată pe fiolă, fie pentru reacții de aglutinare în tuburi, pînă la titrul serului, de asemenea notat pe fiolă.

Pentru identificarea unei tulpini se folosește în primul rînd, tehnica aglutinării pe lamă și se procedează astfel:

O picătură dintr-o suspensie de cultură de 24 de ore pe geloză înclinată, din tulpina de cercetat, se pune în contact, pe o lamă curată și degresată, cu o picătură din seria de seruri aglutinante anti-*Salmonella*, în succesiunea următoare:

1. Aglutinare cu ser polivalent O.
2. Controlul aglutinării tulpinii în soluție clorurosodică $8,5^{0}/_{00}$ pentru eliminarea aglutinărilor nespecifice ale formelor *R*, care aglutinează spontan în soluție clorurosodică $8,5^{0}/_{00}$.
3. Aglutinarea cu ser anti-Vi, în caz că aglutinarea cu ser polivalent O a fost negativă. *Salmonelele* care posedă antigen *Vi* în forma de variație cantitativă ,,viel'' sînt *O* inaglutinabile, dar aglutinează cu serul Vi.
4. Aglutinarea cu serurile de grup O.
5. Aglutinarea cu serurile H de fază specifică și nespecifică, corespunzătoare speciilor de *Salmonella*, aparținînd grupului O, în care s-a obținut aglutinare pozitivă.

Aglutinarea pe lamă se citește cu ochiul liber sau cu o lupă de mînă, după ce în prealabil am imprimat lamei mișcări de înclinare timp de 1 — 2 minute. În cazurile îndoielnice, cînd aglutinările pe lamă sînt tardive și abia vizibile, ca și în cazurile de aglutinare a tulpinii de cercetat cu mai multe seruri de grup O, din cauza unor fracțiuni antigenice comune, se practică aglutinarea în tuburi pînă la titrul serului aglutinant. Se fac diluții binare din serul aglutinant pînă la limita titrului indicat pe fiolă, apoi se adaugă 0,5 ml din suspensia microbiană de cercetat, în concentrație de 500—600 milioane bacterii/ml după scara Brown, în fiecare tub și se așază la termostat. Pentru aglutinările O în tuburi se ține 20 de ore la termostat sau la 52° în baia de apă și apoi se face citirea la aglutinoscop, iar pentru aglutinările cu seruri H se mențin tuburile 3 ore la termostat sau 2 ore la 52° și 20 de ore la temperatura camerei, după care se face citirea. Cel

TABELUL 117

Schema antigenică de diagnostic al salmonelelor după Kauffmann şi White (redusă)

Grupul	Specia de *Salmonella*	Antigen somatic O	Antigen H	
			Specific faza I	Nespecific faza a II-a
A	*S. Paratyphi A*	1,2,12	a	—
	,, (var. smarro)	2,12	a	—
B	*S. paratyphi B*	1,4,5,12	b	1, 2
	,, *typhi murium* (Aertrycke)	1,4,5,12	i	1, 2, 3
	,, *typhi murium* (var. Binns)	1,4,5,12	—	1, 2, 3
	,, *stanley* 7 855	4,5,12	d	1, 2
	,, *heidelberg*	4,5,12	r	1, 2, 3
	,, *chester*	4,5,12	e, h	e, n, x
	,, *derby*	1,4,12	f, g	—
	,, *reading*	4,12	e, h	1, 5
	,, *abortus equi*	4,12	—	e, n, x
	,, *abortus ovis*	4,12	c	1, 4, 6
	,, *abortus bovis*	1,4,12	b	e, n, x
	,, *brandenburg*	4,12	l, v	—
C	*S. paratyphi C* (Hirschfeld)	6, 7, (Vi)	c	1,5
	,, *choleraesuis* (suipestifer) (hogcholera)	6, 7	c	1,5
	,, *choleraesuis* (var. Kunzendorf)	6,7	—	1, 5
	,, *thyphi suis* (suipestifer, tip Gläser)	6,7	c	1, 3, 4, 5
	,, *typhi suis* (var. Voldagsen)	6,7	—	1, 5
	,, *thompson* 8	6,7	k	1, 5
	,, *thompson* 8 (var. Berlin 2 998)	6,7	—	1, 5
	,, *virchow* 4 519	6,7	r	1, 2
	,, *oranienburg* 9 087	6,7	m,t	—
	,, *postdam* 9 781	6,7	l, v	e, n
	,, *bareilly* 3 213	6,7	y	1, 5
	,, *newport* 863	6,8	e, h	1, 2, 3
	,, *newport* (var. Porto-Rico)	6,8	—	1, 2
	,, *newport* (var. Kottbus 4 179)	6,8	e, h	1, 5
	,, *bovis morbificans* 3 640	6,8	r	1, 5
	,, *münchen*	6,8	d	1, 2
D	*S. typhi* (Eberth)	9,12, (Vi)	d	—
	,, *enteritidis* (Gärtner)	9,12	g, m	—
	,, *enteritidis* (var. Dublin)	9,12	g, p	—
	,, *enteritidis* (var. Rostock)	9,12	g, p, u	—
	,, *enteritidis* (var. Moscow)	9,12	g, o, p	—
	,, *sendai*	9,12	a	1,5
	,, *gallinarum* 416	9,12	—	—
	,, *pullorum* 971	9,12	r	—

mai înalt titru aglutinant obţinut ne indică specificitatea reacţiei. Se recomandă ca serurile aglutinante anti-*Salmonella* să se păstreze la gheţar, iar efectuarea diluţiilor de ser pentru aglutinările pe lamă şi în tuburi să se facă în condiţii de sterilitate, folosind soluţie clorurosodică 8,5‰ fenolată 0,25%.

În practica identificării serologice, la noi în ţară se folosesc următoarele seruri aglutinante:

1. Ser polivalent O (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 27).
2. Ser anti-Vi.
3. Ser anti-TO (9,12).
4. Ser anti-TH (d).
5. Ser anti-AO (1, 2, 12).
6. Ser anti-AH (a).
7. Ser anti-BO (4, 5, 12).
8. Ser anti-BH (b).
9. Ser anti-CO (6, 7, 8).
10. Ser anti-CH (c).
11. Ser *antisalmonella typhimurium* H (i).
12. Ser *antisalmonella enteritidis Gärtner* H (gm).

13. Ser antisalmonella-Heidelberg H (r).
14. Ser anti H de fază nespecifică (1, 2, 5).

Serurile aglutinante antisalmonella au indicate pe fiolă titrul aglutinant pentru aglutinarea pe lamă şi titrul aglutinant pentru aglutinarea în tuburi. Toate aceste seruri sînt livrate de Institutul „Dr. I. Cantacuzino".

Coprocultura. La bolnavii spitalizaţi se recoltează în vase colectoare curate şi sterile, o cantitate de 4 — 5 g materii fecale.

La indivizii sănătoşi, suspecţi de a fi purtători de microbi, este recomandabil, datorită eliminării intermitente şi în cantitate mică a bacililor, să se facă recoltarea după administrare prealabilă a unui purgativ salin.

Însămînţarea materiilor fecale pe mediile de cultură trebuie făcută în primele ore după recoltare, pentru a nu permite florei de asociaţie să se multiplice prea abundent şi să inhibe prin fenomene de antagonism bacterian, grupul *Salmonella*. În caz că acest lucru nu se poate realiza, se foloseşte metoda recoltării într-un lichid conservant steril, alcătuit din glicerină 250 ml, apă distilată 750 ml şi ClNa 5 g, care se adaugă, în cantitate de 5 — 10 ml, în vasul colector.

Însămînţarea şi izolarea. Însămînţarea materiilor fecale se face cu ajutorul ansei sau cu o pipetă Pasteur într-un mediu de îmbogăţire care, prin compoziţia sa, favorizează dezvoltarea microbilor din genul *Salmonella* şi *Shigella* şi opreşte dezvoltarea florei de asociaţie, reprezentată mai ales de colibacili şi proteu.

În mod obişnuit se foloseşte ca mediu de îmbogăţire mediul lichid, ca Müller-Kauffmann, care conţine bulion, bilă, CO_3Ca, tetrationat de Na, soluţie iodoiodurată, hiposulfit de Na, iar ca bacteriostatic, verde briliant. După incubaţie de 16 — 20 de ore la 37°, în mediul de îmbogăţire se fac treceri pe mediile selective, în vederea izolării bacteriilor în cultură pură. În vederea creşterii procentului de izolări, se recomandă ca trecerile din mediul de îmbogăţire Müller-Kauffmann să se facă simultan, pe 2 — 3 medii de izolare. Cele mai folosite medii de izolare sînt: mediul Wilson-Blair, mediul Istrate-Meitert, mediul Kristensen-Kauffmann şi *Salmonella-Shigella*.

Pe mediul Wilson-Blair, cel mai selectiv, se trec 2 picături din mediul de îmbogăţire şi se răspîndesc uniform pe toată suprafaţa mediului. Coloniile caracteristice se trec apoi pe medii diferenţiale, Hajna şi Drigalski, pentru studiul caracterelor biochimice. Coloniile lactozo-negative, care prin frotiu indică bacili gram-negativ, sînt trecute pe geloză înclinată, în vederea identificării serologice, după schema structurii antigenice Kauffmann-White. Dacă s-a izolat *S. typhi* se cercetează mai departe şi cărui tip bacteriofagic aparţine tulpina. Respectarea acestor timpi necesită 4 zile pentru obţinerea rezultatului definitiv. Pentru izolarea celorlalte salmonele—cu excepţia *S. typhi*, care se dezvoltă mai dificil — se practică coprocultura prin însămînţare iniţială fără îmbogăţire, direct pe mediul Istrate-Meitert, de pe acest mediu putîndu-se face, după 24 de ore, trecerea pe geloză înclinată a coloniilor suspecte de a aparţine genului *Salmonella*, urmînd ca din acestea să se practice identificarea serologică şi testele biochimice.

Urocultura. Din urina recoltată steril se practică însămînţări cu ansa din sedimentul obţinut prin centrifugare, pe mediul Istrate-Meitert sau *Salmonella-Shigella*, întrucît în acest produs patologic nu există o floră microbiană de asociaţie care trebuie să fie inhibată.

Etapele ulterioare, necesare pentru izolarea şi identificarea *S. typhi* respectă aceleaşi reguli: stabilirea caracterelor morfotinctoriale, de cultură, de structură antigenică şi biochimice.

Bilicultura. Bila reprezintă un mediu favorabil pentru dezvoltarea *S. typhi* atît la bolnav, cît şi la purtătorul de bacili tifici. Se recoltează bila prin tubaj duodenal cu ajutorul sondei Einhorn, sterilizată prin fierbere. Se fac apoi însămînţări pe mediul Istrate-Meitert sau Drigalski şi se continuă etapele diagnosticului bacteriologic ca la urocultură.

Medulocultura. Se foloseşte numai în cazuri excepţionale, cînd epuizarea celorlalte metode nu a dat rezultate. Se practică în special în al treilea septenar de boală, prin puncţia sternului cu un trocar special, steril, în condiţii de asepsie riguroasă, la unirea treimii superioare cu cele două treimi inferioare ale sternului şi după prealabilă anestezie locală cu novocaină. Se extrag 1 — 2 ml sînge sternal şi se fac însămînţarea, izolarea şi identificarea după tehnica hemoculturii.

Diagnosticul serologic

Se bazează pe decelarea anticorpilor specifici în serul bolnavului. Se realizează în practică prin reacţii de aglutinare şi reacţii de fixare a complementului.

Reacția de aglutinare se folosește sub forma analizei serice calitative, denumită și *seroreacția Widal calitativă*, care oferă avantajul de a indica prezența anticorpilor antitifici, separat pentru fiecare antigen folosit. Este o tehnică serologică, capabilă să indice o infecție tifoparatifică la bolnavii vaccinați antitifoparatific sau să evidențieze purtătorii de aglutinine naturale. Se practică în cursul bolii începînd cu al doilea septenar de boală, cînd apar aglutininele antitifice în serul bolnavului.

Metoda folosește antigene standard livrate de Institutul „Dr. I. Cantacuzino", suspensii alcoolate, care conțin exclusiv antigen O și suspensii formolate, care conțin exclusiv antigen H, pentru fiecare microb în parte: *S. typhi O* și *H*; *S. paratyphi AO* și *AH* și *S. paratyphi BO* și *BH*.

Analiza serică calitativă Widal. Se prepară diluții 1/10 și 1/100 în soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$ din serul bolnavului.

— Se aranjează în stelaje 6 serii a cîte 7 tuburi de aglutinare; 3 serii pentru antigenul H (TH, AH, BH) și 3 serii pentru antigenul O (TO, AO, BO).

În fiecare serie de 7 tuburi se repartizează diluții din serul de cercetat, soluție clorurosodică $8,5^0/_{00}$ și antigen după schema din tabelul 118.

TABELUL 118

Tub	1	2	3	4	5	6	7
Soluție clorurosodică $8,5\ ^0/_{00}$	—	0,2	0,3	—	0,2	0,3	0,4
Ser de bolnav, diluție 1/10	0,4	0,2	0,1	—	—	—	—
Idem 1/100	—	—	—	0,4	0,2	0,1	—
Antigen H sau O	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	—
Diluții finale	1/25	1/50	1/100	1/250	1/500	1/1 000	martor

Schema se repetă de 6 ori pentru fiecare antigen în parte. Tuburile cu antigene formolate, seria H se incubează timp de 3 — 4 ore la 37° sau 2 ore la 52° (la baie de apă), după care se face o primă citire a rezultatelor.

Tuburile care conțin antigene alcoolate se incubează timp de 20 de ore la termostat la 37° sau la baie la 52°. La 24 de ore se face citirea finală la aglutinoscop a rezultatelor la ambele serii.

Interpretarea seroreacției Widal calitative. La bolnavi cu febră tifoidă și paratifoidă, nevaccinați, diagnosticul serologic este ușor de interpretat; la vaccinați interpretarea este uneori dificilă.

Prezența anticorpilor normali variază de la un grup de populație la altul, în funcție de gradul de endemie tifică; în general, la indivizii nevaccinați valorile anticorpilor pentru *Salmonella typhi* merg pînă la 1/100, pentru *S. paratyphi A* pînă la 1/40 și pentru *S. paratyphi B* pînă la 1/100. La vaccinați se constată o creștere mare a agutininelor H, care pot ajunge pînă la 1/500 — 1/1 000 în lunile următoare vaccinării, și se mențin timp mai îndelungat. Aglutininele O la indivizii vaccinați ating valori mai scăzute (1/100 — 1/200) și scad repede, în următoarele 2 — 3 luni după vaccinare. La bolnavi succesiunea apariției aglutininelor este inversată în comparație cu vaccinații. Primele care apar la bolnav și în titruri mai ridicate sînt aglutininele O și apoi cele H, iar la vaccinați primele care apar și în titruri mai ridicate sînt aglutininele H și apoi cele O. La bolnavii vaccinați recent, pînă la 3 luni de la vaccinare, reacțiile serologice nu permit indicații de diagnostic; de asemenea, la indivizii cu reactivitate scăzută, deoarece aglutininele nu apar.

Pentru ca diagnosticul serologic să fie corect folosit, trebuie să repetăm reacțiile în cursul bolii, spre a evidenția dinamica apariției și creșterii titrului aglutininelor specifice, singura dovadă care ne arată că este vorba de o elaborare activă și reală de anticorpi în organism. În condițiile țării noastre titrurile care pot da indicații de boală pentru aglutininele O și H, la nevaccinați, sînt cel puțin 1/100 pentru *S. typhi* și *S. paratyphi A* și de 1/200 pentru *S. paratyphi B*, dacă cresc pe măsura evoluției bolii. La vaccinați la care găsim totdeauna anticorpi reziduali H, diagnosticul serologic are valoare mai mult pentru anticorpii O, dacă titrul acestora depășește 1/100 și este în creștere.

La indivizi vaccinați incomplet sau nesigur, o seroreacție calitativă Widal, care arată un titru mai ridicat de anticorpi H și titruri sub 1/100 pentru aglutininele O indică mai probabil o reacție anamnestică la un vechi vaccinat. Și în această situație, numai studiul dinamic al aglutininelor, prin repetarea seroreacției calitative, clarifică diagnosticul.

Reacția de fixare a complementului. Serodiagnosticul prin reacția calitativă Widal nu poate să asigure, în toate cazurile, la vaccinați, diagnosticul de febră tifoidă. Din aceste motive se folosește, uneori, reacția de fixare a complementului, care se bazează pe evidențierea anticorpilor fixatori de complement Vi. Anticorpii fixatori de complement Vi nu se găsesc în serul vaccinaților antitifoparatifici, sănătoși; ei apar însă la bolnavi în a șaptea zi de boală și pot fi găsiți în ser circa 70 — 80 de zile de la începutul bolii. Titrul anticorpilor fixatori de complement Vi pe lîngă valoarea de diagnostic, oferă și posibilitatea unor indicații de prognostic. Cu cît titrul lor este mai ridicat, cu atît forma clinică este mai gravă și mai prelungită.

Pentru executarea reacției se folosește o tulpină de *Salmonella* bogată în antigen Vi, care, după suspendare în soluție clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$ și încălzire la 60° timp de o oră, servește ca antigen ce poate fi păstrat la gheţar 6-8 zile.

Diagnosticul purtătorilor de bacili tifici

Se admite astăzi că din 100 de bolnavi de febră tifoidă, 2 — 3% rămîn purtători permanenți de bacili. Acești purtători reprezintă tot atîtea posibilități de izbucniri epidemice sau de apariție a unor cazuri sporadice de febră tifoidă.

Prin descoperirea, de către Felix, în 1935, că în serul convalescenților de febră tifoidă se mențin la titruri ridicate aglutininele anti-Vi, atît timp cît bacilul persistă în fecale s-a putut stabili un indicator indirect al stării de purtător de bacili tifici. Această corelație a ușurat mult metodele de depistare a stării de purtător de microbi.

Astăzi, diagnosticul purtătorilor de bacili tifici se practică în două etape: o primă etapă se realizează prin cercetarea serologică a prezenței aglutininelor Vi prin seroreacția Vi, care dă eticheta de purtător; după trierea celor cu seroreacție Vi pozitivă se trece la etapa a doua a izolării din materii fecale, urină și bilă a bacililor tifici, care stabilește starea de excretor. Starea de excretor se diagnostichează adeseori cu greutate și cere coproculturi repetate.

Seroreacția de aglutinare Vi. Reacția de aglutinare în tuburi Vi se efectuează în tuburi sterile, folosind serul de cercetat diluat 1/5, iar ca antigen, o tulpină standard de *Salmonella* Vi în cultură vie de 24 de ore pe agar înclinat în concentrație de 500 — 600 milioane bacterii/ml după scara nefelometrică Brown sau antigenul Vi formolat al Institutului „Dr. I. Cantacuzino".

TABELUL 119

Schema efectuării seroreacției de aglutinare Vi

Tub	1	2	3	4	5	Martor
Soluție clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$ (ml)	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser de cercetat, diluție 1/5 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Suspensie tulpină Vi (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Titrul final	1/10	1/20	$\boxed{1/40}$	1/80	1/160	—

Incubare la 37° timp de 2 ore, citire definitivă la aglutinoscop după încă 20 de ore la temperatura camerei.

Pentru a evita reacțiile nespecifice mai ales cînd se efectuează seroreacții Vi în serie este util să folosim următorii martori: un martor pentru controlul formei „S" a tulpinii (0,5 ml suspensie cultură + 0,5 ml ser fiziologic), în care nu trebuie să existe aglutinare; un martor pentru controlul calității antigenului (0,5 ml suspensie cultură sau antigen formolat + 0,5 ml ser aglutinant anti-Vi la diluția limită), care trebuie să prezinte o aglutinare intens pozitivă; un martor pentru serul de cercetat (0,5 ml ser de cercetat, diluție 1/10 + 0,5 ml soluție clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$), care trebuie să fie totdeauna negativ.

Titrurile peste 1/40 sînt de luat în considerație drept reacții pozitive. Reacția serică Vi pozitivă indică prezența bacililor în organismul cercetat; ea are o valoare de orientare. Prin coproculturi, uro- și biliculturi repetate se confirmă starea de excretor prin izolarea și identificarea bacilului. În cazul că, prin identificarea serologică s-a stabilit prezența în organismul purtătorului a *S. typhi*, se recurge în continuare, la aplicarea lizotipiei, pentru a decela tipul bacteriofagic al tulpinii izolate.

Diagnosticul prin lizotipie cu bacteriofagi Vi. Curînd după descoperirea antigenului Vi la *S. typhi* s-a putut constata existența bacteriofagilor specifici pentru antigenele Vi ale bacililor tifici. Ca urmare a acestor constatări, s-a căutat să se găsească o metodă care să permită diferențierea bacililor tifici prin intermediul bacteriofagilor Vi specifici, lucru care s-a putut realiza datorită descoperirii bacteriofagului Vi de tip, care posedă o afinitate specifică de tulpină pentru bacilii tifici cu antigen Vi.

Acțiunea unui bacteriofag asupra unei bacterii se poate evidenția *in vitro*, prin depunerea unei picături de bacteriofag pe o cultură tînără din tulpina de bacil tific de cercetat însămînțată pe plăci de geloză sub formă de arii rotunde, cu diametrul de 1 cm, dinainte însemnate și notate pe fundul plăcilor cu semne corespunzătoare preparatelor bacteriofagice utilizate pentru lizotipie.

Prezența bacteriofagului specific tulpinii de cercetat este indicată prin formarea unei suprafețe de liză sau plajă, pe aria de cultură unde tulpina a fost lizată de bacteriofag.

Cu această metodă s-a putut obține un număr de 37 de tipuri bacteriofagice Vi de *S. typhi*, notate de la *A* la *T* și, în continuare, cu cifre de la 25 la 37. Pe aria de cultură pot apărea diferite grade de liză, de la o liză totală, notată LC = liză confluentă, care arată cel mai înalt grad de sensibilitate a tulpinii la preparatul bacteriofagic, respectiv pînă la apariția numai a cîtorva plaje de dimensiuni variate, pe aria de cultură, notîndu-se cu +++, ++, + și±.

Diagnosticul prin lizotipie este important din punct de vedere epidemiologic, deoarece:

— o tulpină microbiană își păstrează constante aceleași caractere de lizotipie, atît în timpul bolii și convalescenței, cît și în timpul stării de purtător de microbi;

— într-un focar epidemic se menține constant același tip bacteriofagic de *S. typhi*. Datorită acestor constatări și la noi în țară s-a putut stabili astfel originea infecției și filiația cazurilor pentru numeroase focare epidemice de febră tifoidă.

Avînd în vedere că, în febra tifoidă sursa de infecție este legată în special de omul bolnav și de purtătorul de microbi, iar stabilirea originii infecției constituie pivotul întregii anchete epidemiologice, ne putem da seama de valoarea acestei metode de diagnostic în combaterea și prevenirea epidemiilor de febră tifoidă.

Sensibilitatea la antibiotice și chimioterapice

S. typhi nu este sensibilă la penicilină, streptomicină și sulfamide. Antibioticele active sînt cloramfenicolul și clortetraciclina. Ambele antibiotice administrate bolnavilor de febră tifoidă scurtează mult evoluția bolii. Asocierea corticoterapiei la tratamentul cu antibiotice în formele toxice, grave, de febră tifoidă, permite o mai bună difuzare a antibioticului și ameliorează rapid starea generală a bolnavului. Indivizilor care fac recidive după tratament cu cloramfenicol li se poate asocia la tratament vaccinoterapia cu vaccin T.A.B.

Tratamentul antimicrobian al purtătorilor de bacili tifici este mult mai dificil de realizat. Colecistectomia, vaccinoterapia și cloramfenicolul sau clortetraciclina nu sînt eficiente decît într-un număr restrîns de cazuri.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL FEBREI TIFOIDE

Schema A

Diagnosticul în prima săptămînă de boală

— Izolarea b. tific prin tehnica hemoculturii, preferabil cu acul adaptat la balonul cu mediu.
— Însămînțarea unei suspensii din materii fecale în mediul de îmbogățire Müller-Kauffmann sau direct prin epuizarea ansei
pe mediile Istrate-Meitert sau Shigella-Salmonella, Vogelsang și Wilson-Blair.
— Se controlează macroscopic balonul de hemocultură pentru apariția turbidității, semn al creșterii bacteriene. Se însămîn-
țează 1—2 tuburi cu geloză înclinată și 1 tub cu mediul Tittsler-Sandholzer cu cîteva picături din mediul de hemocultură.
Se examinează direct între lamă și lamelă și prin frotiu colorat Gram o picătură din hemocultură. Se repetă
zilnic aceste operații pînă la izolarea microbului, cu respectarea condițiilor de sterilitate necesare pentru a nu contamina
secundar hemocultura. O hemocultură pentru *S. typhi* se consideră negativă, numai dacă după 14 zile de incubare la termo-
stat și control zilnic macroscopic, microscopic și prin subculturi, nu s-a decelat prezența bacteriilor.
— Se controlează macroscopic aspectul coloniilor pe mediile Istrate-Meitert și Wilson-Blair și microscopic prin frotiu colorat
Gram. Se efectuează treceri pe geloză înclinată și bulion dintr-o colonie tipică de pe mediile Istrate-Meitert și Wilson-
Blair și microscopic prin frotiu colorat cu Gram.

- Se efectuează treceri pe geloză înclinată şi bulion simplu dintr-o colonie tipică de pe mediile Istrate-Meitert şi Wilson-Blair.
- Se controlează subculturile prin frotiu pentru puritate şi se efectuează :
  a) Identificarea serologică a tulpinii izolate din cultura de 18—20 de ore pe geloză înclinată prin aglutinare pe lamă şi în tuburi după instrucţiunile Institutului „Dr. I. Cantacuzino" pentru folosirea serurilor agutinante *antisalmonella*.
  b) Din cultura în bulion se face determinarea sensibilităţii la antibiotice prin metoda difuzimetrică calitativă în agar.
  c) Se efectuează subculturi pentru studiul caracterelor biochimice pe mediul Hajna, pe mediul lichid pentru fermentarea zaharurilor, pentru producerea indolului, a producerii de urează, lichefierea gelatinei, comportarea faţă de KCN etc.

După identificarea serologică a tulpinii de *S. typhi* izolată se poate elibera un buletin de analiză provizoriu în care se indică caracterele morfologice, de cultură şi antigenice, urmînd ca buletinul definitiv să fie completat cu caracterele biochimice, sensibilitatea la antibiotice şi eventual stabilirea prin lizotipie a tipului bacteriofagic Vi de *Salmonella typhi*.

În această etapă evolutivă a bolii, ţinînd seama de patogenia infecţiei tifice, metodele diagnosticului de laborator trebuie să pună accentul pe izolarea agentului etiologic din sînge.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL FEBREI TIFOIDE

Schema B

Diagnosticul după prima săptămînă de boală

- Izolarea b. tific prin tehnica hemoculturii, preferabil cu acul montat la balonul cu medii.
- Însămînţarea unei suspensii în ser fiziologic steril, din materii fecale, în mediul de îmbogăţire Müller-Kauffmann sau direct prin epuizarea ansei pe suprafaţa a cîte 2 plăci din mediile Istrate-Meitert sau Salmonella-Shigella, Vogelsang şi Wilson-Blair.
- Se examinează serul bolnavului pentru decelarea anticorpilor specifici prin reacţia serică calitativă Widal după instrucţiunile de folosire a antigenelor alcoolate şi formolate ale bacililor tific, paratific A şi B, produse de Institutul „Dr. I. Cantacuzino".
- Se controlează macrosocopic balonul de hemocultură pentru apariţia turbidităţii, semn al creşterii bacteriene. Se însămînţează 1—2 tuburi cu geloză înclinată şi 1 tub cu mediul Tittsler-Sandholzer, cu cîteva picături din mediul de hemocultură. Se examinează direct între lamă şi lamelă şi prin frotiu colorat Gram o picătură din mediul de cultură. Se repetă zilnic aceste operaţii pînă la izolarea microbului, cu respectarea condiţiilor de sterilitate necesare pentru a nu contamina secundar hemocultura. O hemocultură pentru *S. typhi* se consideră negativă numai dacă după 14 zile de incubare la termostat prin controlul zilnic macroscopic, microscopic şi prin subcultură nu am decelat prezenţa bacteriilor.

  În cazurile cînd hemocultura se face tardiv şi nici prin coprocultură nu am reuşit să izolăm microbul, se poate folosi metoda izolării din sîngele sternal prin medulocultură sau prin uro- şi bilicultură.
- Se face citirea şi interpretarea reacţiei serice calitative Widal, la aglutinoscop şi se eliberează primul buletin de serodiagnostic după modelul următor :

  Seroreacţia calitativă Widal, practicată cu antigene alcoolate TO, PAO şi PBO şi antigene formolate TH, PAH şi PBH a fost pozitivă pentru *S. typhi* în titrurile TO 1/500 ; TH 1/250 şi negativă pentru paratificii A şi B (PAH 1/25 ; PAO — ; PBH 1/50 ; PBO 1/25).
- Se controlează macroscopic aspectul coloniilor pe mediile Istrate-Meitert şi Wilson-Blair şi microscopic prin frotiu colorat Gram. Se efectuează treceri pe geloză înclinată şi bulion dintr-o colonie tipică de pe mediile Istrate-Meitert şi Wilson-Blair.
- Se controlează subculturile pentru puritate, prin frotiu şi se efectuează :
  a) Identificarea serologică a tulpinii izolate prin aglutinare pe lamă şi în tuburi după instrucţiunile Institutului „Dr. I. Cantacuzino" pentru folosirea serurilor aglutinante *antisalmonella*.
  b) Din cultura în bulion se face determinarea sensibilităţii la antibiotice prin metoda difuzimetrică calitativă în agar.
  c) Se efectuează subculturi pentru studiul caracterelor biochimice pe mediul Hajna, pe mediul lichid pentru fermentarea zaharurilor, pentru producerea de indol, a producerii de urează, lichefierea gelatinei, comportarea faţă de KCN etc.
- După identificarea serologică a tulpinii de *Salmonella typhi* izolată se poate elibera un buletin de analiză provizoriu, în care se indică caracterele morfologice, de cultură şi antigenice, urmînd ca buletinul definitiv să fie completat cu caracterele biochimice, sensibilitatea la antibiotice şi eventual prin lizotipie a tipului bacteriofagic Vi.
- După 4—5 zile de la efectuarea primei seroreacţii calitative se efectuează cea de a doua seroreacţie Widal pentru a confirma diagnosticul serologic prin aprecierea dinamică a creşterii titrurilor iniţiale de anticorpi specifici. Se eliberează al doilea buletin de serodiagnostic şi se menţionează, în concluzie, creşterea titrului aglutininelor specifice.

În această etapă a bolii, ţinînd seama de patogenia infecţiei tifice, metodele diagnosticului de laborator trebuie să pună accentul pe izolarea agentului etiologic din fecale, urină şi să folosească serodiagnosticul calitativ Widal ca metodă complementară de diagnostic.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL FEBREI TIFOIDE

Schema C

Diagnosticul purtătorilor de bacili

- Se examinează serul de cercetat pentru prezenţa aglutininelor anti-Vi. Se apreciază ca reacţii pozitive numai titrurile de aglutinare care depăşesc diluţia 1/40.
- Se efectuează coproculturi şi biliculturi repetate, pentru a izola tulpina de *S. typhi* din organismul bănuit a fi purtător, pe baza indicaţiilor epidemiologice sau a prezenţei aglutininelor Vi.

— Se efectuează cercetarea lizotipului tulpinii izolate după tehnica Craigie și Yen cu bacteriofagi Vi, în vederea stabilirii sursei de infecție și filiației cazurilor.

(Pentru executarea lizotipiei cu bacteriofagi Vi se va trimite tulpina izolată stocată pe 2 tuburi cu geloză dreaptă parafinate, la laboratorul regional al Inspecției de stat pentru igienă și protecția muncii sau la Centrul național de bacteriofag-referință de pe lîngă Institutul „Dr. I. Cantacuzino", împreună cu o fișă care să indice proveniența tulpinii și caracteristicile bacteriologice studiate.)

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TOXIINFECȚIILOR ALIMENTARE CU *SALMONELLA*

Schema de diagnostic

Produse patologice **: materii fecale, lichid de vomismente, porțiuni din alimente contaminate**

— Din produsul patologic sau alimentul contaminat se efectuează o suspensie în soluție clorurosodică 8,5‰ din care se fac următoarele însămînțări :

Cu pipeta Pasteur cîteva picături din suspensia bacteriană de cercetat în atîtea tuburi cu mediul de îmbogățire Müller-Kauffmann cîte produse patologice sau alimente contaminate au fost recoltate.

Cu ansa bacteriologică, prin tehnica epuizării ansei, din suspensia bacteriană de cercetat pe suprafața unei plăci Petri cu mediul Istrate-Meitert, Vogelsang sau Wilson-Blair. Atîtea plăci cîte produse patologice sau alimente contaminate au fost recoltate.

— Se controlează macroscopic cu lupa fiecare placă cu mediul Istrate-Meitert pentru apariția coloniilor mici, translucide, verzui sau Vogelsang pentru coloniile albastre și se efectuează treceri pe geloză înclinată din cîteva colonii tipice și un control microscopic prin frotiu colorat Gram.

— În caz că pe mediul Istrate-Meitert sau Vogelsang nu s-au dezvoltat colonii de *Salmonella*, efectuăm subculturi pe o nouă serie de plăci Istrate-Meitert, Vogelsang sau Wilson-Blair și incubăm la 37°.

— Se controlează subculturile pe geloză înclinată pentru puritate prin frotiu colorat cu Gram și pentru mobilitate prin examen între lamă și lamelă. Se procedează, în continuare, la identificarea serologică a tulpinii izolate din cultura de 18—20 de ore pe geloză înclinată prin aglutinare pe lamă și în tuburi după instrucțiunile Institutului „Dr. I. Cantacuzino", pentru folosirea serurilor aglutinante *antisalmonella*.

După identificarea serologică a tulpinii de *Salmonella* izolată, se poate elibera buletinul de analiză în care se indică caracterele morfologice de cultură și antigenice care au permis stabilirea diagnosticului de laborator.

Deoarece în toxiinfecțiile alimentare cu salmonele diagnosticul are un caracter de urgență, completarea datelor de laborator privind testele biochimice și lizotipia, necesare pentru caracterizarea definitivă a tulpinii izolate, se vor efectua numai la cerere în vederea eventualelor investigații epidemiologice.

BIBLIOGRAFIE

ABDUSAMATOV M. — Studiul comparativ al reacției creșterii titrului fagic și al metodei bacteriologice în diagnosticul febrei tifoide, la bolnavi și convalescenți, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1960, nr. 1.

BALȘ M., MEITERT EUGENIA — Studiu comparativ, experimental și practic al valorii mai multor lichide de conservare pentru salmonele și bacili dizenterici, *Microbiologia* (*București*), 1959, nr. 1, p. 71—78.

BALȘ M., MEITERT EUGENIA, ZILIȘTEANU EUGENIA — Studiu experimental și practic al valorii comparative a mai multor medii de îmbogățire pentru izolarea salmonelelor prin coprocultură, *Microbiologia* (*București*), 1956, nr. 3, p. 27—31.

BALȘ M., MEITERT EUGENIA, ZILIȘTEANU EUGENIA — Studiu experimental și practic al valorii comparative a unor medii selective pentru izolarea salmonelelor, *Microbiologia* (*București*), 1957, nr. 3, p. 268—272.

BALȘ M., ZILIȘTEANU C. — Tehnica de orientare în diagnosticul coprologic al febrei tifoide cu ajutorul anticorpilor fluorescenți, *Microbiologia* (*București*), 1961, nr. 6, p. 523—526.

BALȘ M., CRĂCEA E., MEITERT EUGENIA — Reacția Widal pe lamă cu antigene colorate, *Microbiologia* (*București*), 1959, nr. 3, p. 283—288.

BILIBIN A. F., DVURECENSKAIA, MARGORINA L. M. — Clinica și diagnosticul salmonelozei, *Sovetsk. Med.*, 1959, nr. 12.

DUMAS J. — Bactériologie médicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 400—420, 423—435.

GAVRILĂ J., COMES S. L., MUREȘAN T., BUCIU M. IGNA M., CUCU A., ȘERBAN J. — Comportarea titrului aglutininelor anti-H și anti-O în febra tifoidă tratată cu cloramfenicol, *Microbiologia* (*București*), 1958, nr. 1, p. 55—64.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 426—459.

GHERMAN D., ZALMAN M., LEVIN S., PETRILĂ J. — Contribuții la studiul metodelor de depistare a excretorilor de bacili tifici în mediul rural, *Microbiologia* (*București*), 1958, nr. 3, p. 247—256.

GOLDFARB D. M., OSTROVSKAIA Z. S. — Obținerea unui bacteriofag tific indicator specific prin metoda trecerilor intensive, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1960, nr. 1.

GORUN VERA — Unele probleme de diagnostic bacteriologic la Salmonele, *Microbiologia* (*București*), 1959, nr. 1, p. 17—24.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 113—135.

IOSUB C., BERCOVICI C., SECHTER J., IOSUB R. — Schema pentru selecționarea în masă, după profilul biochimic, *Microbiologia* (*București*), 1958, nr. 5, p. 411—418.

KILESSO V. A. — Cu privire la aplicarea practică a metodei tipajului bacteriofagic la bacilul tific, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1958, nr. 4, p. 38—41.

KOLMER J., BOERNER F. — Approved laboratory techniques, ed. a 4-a, Ed. Appleton-Century, New York, 1945, p. 471—475.

KOLMER J. A. — Clinical diagnosis by laboratory examinations, ed. I, Ed. Appleton-Century, New York, 1944, p. 937—941.

KUNTSMAN E. S. — Asupra diagnosticului serologic al salmonelozelor la copii, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1957, nr. 7, p. 144.

LISKOVTSEV M. M. — Serodiagnosticul paratifoidei A, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk*), 1958, nr. 4, p. 60.

MEISEL M. N., KABANOVA E. A., LEVINA E. N., STRAKHOVA V. A. — O metodă accelerată luminiscentă pentru indicarea bacteriilor patogene din grupul intestinal, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1959, nr. 12, p. 3—6.

MACKIE T. J., McCARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 434—445.

MEKLER S. S. — Depistarea şi diferenţierea salmonelelor într-un laborator de spital în bolile intestinale acute, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1960, nr. 1.

MIROLIUBOVA L. V. — Semnificaţia diagnostică a structurii coloniilor tinere în grupul bacteriilor intestinale, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1959, nr. 12, p. 11—15.

MORGAN R. H.— Bacterial and mycotic infections of man, editat de Dubos R., ediţia 2-a, Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 408—410, 420—437.

NESTORESCU N., POPOVICI MARCELA — Bacteriologie medicală (sub red. prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 399—411 şi 434—480.

SINAI G. I., TARASOVA A. P. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, G. J. Sinai şi O. G. Bergher (traducere din limba rusă), Ed. de stat pentru literatură ştiinţifică, Bucureşti, 1952, p. 276—303.

STITT E. R., CLOUGH P. W., BRANHAM S. E. — Practical Bacteriology, Hematology and Parasitology, ed. a 10-a, Ed. Blakiston, New York, 1948, p. 102—103, 123—131.

STOCKER B. A. D. — Plate culture method for determining phase of Salmonella culture, *J. Hyg.*, 1949, vol. 47, p. 398—399.

THOMPSON R. V. — Microbiology and Epidemiology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Londra, 1958, p. 353—357.

TIMAKOV V. D., GOLDFARB D. M. — Reacţia de creştere a titrului fagului ca metodă de diagnostic a bolilor infecţioase şi de indicare a prezenţei bacteriilor patogene, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1960, nr. 1.

TOPLEY and WILSON'S — Principles of bacteriology and immunity, ed. a 4-a, Ed. Edward Arnold, Londra, 1955, vol. I, p. 801—856; vol. II, p. 1 720—1 746.

VASILIU E. — Mediul Wilson-Blair uscat, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1956, nr. 3, p. 81—82.

VLĂDOIANU I. R. — Lizotipia enterobacteriilor patogene, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1959, nr 5, p. 385—404.

WATSON K. C. — Clot culture with streptokinase for isolation of *S. typhi* from the blood stream, *J. Lab. clin. Med.*, 1955, vol. 46, p. 128—132.

WHITBY C., HYNES M. — Medical bacteriology, ed. a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 189—203.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, partea I, p. 335—402.

ZILIŞTEANU C., COMBIESCU CORNELIA, ILIAN INGE, GORUN VERA — Studiul eficacităţii mediului cu selenit pentru izolarea bacilului tific, *Microbiologia*, (*Bucureşti*), 1956, nr. 2, p. 79—85.

ZILIŞTEANU C., GOLĂESCU MARIA — Reacţia de precipitare cu endotoxină tifică în diagnosticul febrei tifoide, comparativ cu celelalte metode de serodiagnostic. *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1957, nr. 5, p. 415—420.

ZINSSER H. — Textbook of bacteriology, ed. a 11-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New-York, 1957, p. 373—396.

* * * — Instrucţiunile Institutului „Dr. I. Cantacuzino" pentru întrebuinţarea serurilor aglutinante *antisalmonella*.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU BACTERII DIN GENUL *SHIGELLA*

Familia : *Enterobacteriaceae*. Genul : *Shigella*. Specia tip : *Shigella dysenteriae*.

Generalităţi

Sub numele de bacterii dizenterice sau *Shigellae* se cuprind o serie de microbi Gram-negativ, imobili, nesporulaţi, de formă bacilară, cu capetele rotunjite, cu dimensiuni de 1—3 μ, aerobi şi anaerobi facultativ, care provoacă la om dizenteria bacilară.

Shigelele se localizează în intestinul gros; ele dau leziuni de tip ulcerativ, mai frecvent în regiunea sigmoidiană a colonului. Sînt eliminate prin materiile fecale, atît de bolnavi şi convalescenţi, cît şi de bolnavii cronici de dizenterie.

Clasificarea shigelelor. Pe baza structurii antigenice şi comportării faţă de manită au fost stabilite 4 grupe, fiecare împărţită în mai multe tipuri şi subtipuri.

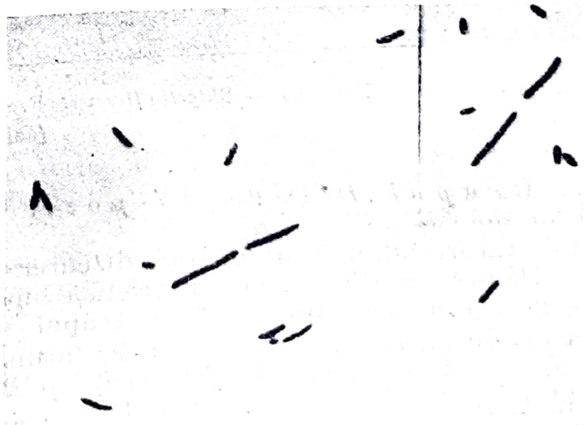


Fig. 335. — *Shigella shigae*. Frotiu dintr-o cultură în bulion (coloraţie Gram).

I. *Grupul A* (*manită-negativ*): *Shigella dysenteriae*, cu 7 tipuri serologice:

— tip 1 (*Shigella shigae*; b. *Grigoriev-Shiga*)
— tip 2 (b. *Schmitz*)
— tip 3
— tip 4
— tip 5 (grupul Large-Sachs)
— tip 6
— tip 7

II. *Grupul B* (*manită-pozitiv*): *Shigella flexnerii*, cu următoarele tipuri serologice înrudite între ele: 1 a, 1 b, 2 a, 2 b, 3, 4 a, 4 b, 4 c, 5, 6 şi variantele x şi y.

III. *Grupul C* (*manită-pozitiv*): *Shigella boydii*, cu 11 tipuri serologice.

IV. *Grupul D* (*manită-pozitiv*): *Shigella sonneii* „*S*" şi „*R*".

Unii autori adaugă în grupul dizenteric şi tipul *Alkalescens dispar*, cu proprietăţi biochimice şi serologice apropiate de grupul coli.

La noi în ţară, cel mai frecvent se întîlneşte grupul B, şi anume: *Sh. flexnerii*, tip 2 a, urmat de 1 b, tipul 3, 4 a şi 5. Urmează, ca frecvenţă, grupul D, *Sh. sonnei*; grupul A, *Shigella shigae*, altădată foarte frecvent, nu se mai întîlneşte decît sporadic, în nordul Ardealului şi mai puţin în restul ţării; grupul C, *Sh. boydii* a fost semnalat în unele părţi ale ţării, ca: Moldova, regiunile Braşov, Bucureşti etc.

Caractere de cultură

Microbii se dezvoltă uşor pe mediile obişnuite. În bulion, tulbură uniform. Pe geloză, se cultivă sub formă de colonii semitransparente, umede, albicioase. Pe mediul Drigalski, se dezvoltă sub formă de colonii mici, albastre şi transparente, fără a-l modifica. De asemenea, nu modifică mediul Levin şi mediul Istrate-Meitert, larg utilizat la noi. Coloniile de coli virează în galben, iar cele de *Proteus* au centrul de culoare verde închis şi periferia verde deschis.

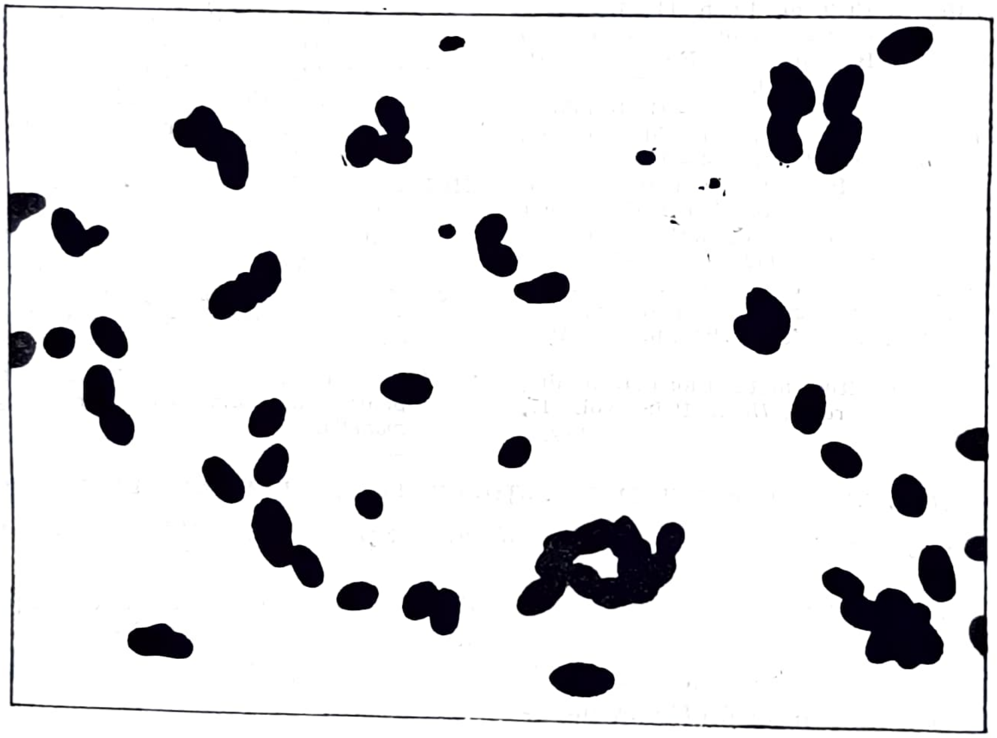


Fig. 336. — *Shigella flexneri.* Frotiu dintr-o cultură pe mediul Istrati-Meitert (coloraţie Gram).

Fenomenul de variaţie microbiană *S-R* se întîlneşte foarte frecvent la shigele, dar în special la *Shigella sonneii*. Forma *R*, cu colonii rugoase la dispersia pe plăci, devine aglutinabilă la tripaflavina în soluţie de 1/500 şi de asemenea, aglutinabilă în soluţii concentrate saline şi în soluţii acide. Creşte în bulion sub formă de depozit cu supernatant limpede, nu mai aglutinează cu serul anti-Sonne „*S*”, ci numai cu serul anti-Sonne *R*, în grunji foarte mărunți.

Caractere biochimice

Bacteriile din genul *Shigella* sînt aerobe și anaerobe facultativ. Reduc nitrații în nitriți. Dau reacția roșului de metil. Reacția Voges-Proskauer este negativă. Nu utilizează citratul de sodiu ca sursă de carbon și nu lichefiază gelatina. Nu coagulează laptele (pentru fermentarea zaharurilor și reacția indolului vezi tabelul 115).

TABELUL 120

Caracterele biochimice ale genului *Shigella*
(Edwards și Ewing)

Fermentează glucoza cu producere de acid				
Manită-negativ		Manită pozitiv		
Indol negativ	Indol pozitiv	Lactozo-negativ		Lactozo-pozitiv
Sh. dysenteriae 1	*Sh. dysenteriae* 2	Indol negativ	Indol pozitiv	Indol negativ
3	7	*Sh. flexnerii* 6	*Sh. flexnerii* 1	*Sh. sonneii*
4	8	*Sh. boydii* 1	2	
5		2	3	
6		3	4	
		4	5	
		6	*Sh. boydii* 5	
		8	7	
		10	9	

Rezistența

În mediul extern, shigelele au o rezistență relativ scăzută. Căldura la 55° omoară bacteriile dizenterice într-o oră. Dezinfectantele puternice ca fenolul în concentrație de 1%, le omoară în 30 de minute.

Shigelele sînt deosebit de sensibile la acțiunea bacteriofagilor specifici și la variațiile pH. În stare uscată rezistența este crescută și se pot păstra viabile pînă la 20–30 de zile în mediul extern. Bacteriile dizenterice sînt sensibile la acțiunea sulfamidelor și antibioticelor. În ultimii ani tratamentul cu sulfamide se folosește tot mai rar, iar dintre antibiotice se folosesc, de preferință, cloramfenicolul și tetraciclinele. Datorită faptului că în prezent se izolează și tulpini rezistente la unele antibiotice este necesar să se efectueze concomitent cu izolarea și identificarea tulpinii de *Shigella*, testarea sensibilității la antibiotice.

Patogenitatea la om

Shigelele provoacă la om dizenteria bacilară, al cărei tablou simptomatic acut este dominat de caracterul scaunelor frecvente, constituite din mucozități, serozități sanguinolente, puroi și resturi necrotice. Deseori scaunele nu sînt însă sanguinolente. Orice simptom de enterocolită, atît la copii, cît și la adulți trebuie suspectat de a fi produs de bacili dizenterici. Sindromul dizenteriform este completat de colici, tenesme, stare toxică, deshidratare, manifestări articulare și tulburări nervoase, în special în dizenteria cu *Shigella shigae.* Ulcerațiile colonului sînt întinse, dar superficiale. Gravitatea clinică a dizenteriei cu *b. Grigoriev-Shiga* se datorește prezenței unei exotoxine puternice. Ceilalți bacili dizenterici acționează numai prin endotoxine.

Patogenitatea la animalele de laborator

Shigelele inoculate pe cale subcutanată sau intravenoasă la iepure sau șoarece provoacă moartea animalului, cu fenomene intestinale și paralizia membrelor posterioare. Bacteriile dizenterice dau la cobai o keratită specifică. Pentru obținerea sindromului dizenteriform trebuie folosite maimuțe, singura specie de animale de laborator care pot fi infectate numai cu doze mari de *Shigella.*

Diagnosticul de laborator

Produsele patologice care se recoltează sînt materiile fecale și numai rareori ser de la bolnav.

Materiile fecale vor fi recoltate în recipiente sterile şi se vor trimite urgent laboratorului, pentru a evita distrugerea shigelelor prin acţiunea antagonistă a florei de asociaţie şi a bacteriofagilor antidizenterici. Însămînţările se fac imediat, întrucît, prin menţinere la temperatura obişnuită, pH scaunului scade, datorită florei de asociaţie, iar bacteriile dizenterice nu rezistă, în timp ce flora asociată se dezvoltă abundent. În cazul în care examenul nu poate fi făcut imediat, produsul recoltat se ţine la rece, de preferinţă la gheţar, sau se utilizează un lichid conservant format din:

— Glicerină	300 ml
— Apă distilată	700 ml
— Clorură de sodiu	4,2 g
— Fosfat monopotasic	1 g
— Fosfat bipotasic	3,1 g

Se ajustează pH la 7,2 şi se sterilizează la autoclav.

În acest lichid conservant bacilii rezistă mai multe zile la gheaţă.

La copii şi în formele cronice de boală se recomandă recoltarea directă din rect, cu ajutorul unei sonde Nélaton sau cu un tampon steril. La bolnavii cronici, aparent sănătoşi, recoltarea se face după o prealabilă purgaţie cu sulfat de sodiu sau preferabil prin rectosigmoidoscopie. Scaunele bolnavilor au un aspect mucos, alteori cu striuri de sînge, asemănătoare cu zeama de carne, uneori chiar hemoragice; de semnalat însă că prezenţa sîngelui în scaun nu este obligatorie.

Diagnosticul orientativ de laborator se va baza pe stabilirea caracterelor morfologice, de cultură şi biochimice.

În cazul în care se procedează la examenul direct, între lamă şi lamelă, a unei porţiuni de mucus, se constată polinucleare, monocite, hematii şi microbi imobili. Examenul microscopic direct are numai o valoare de orientare şi nu este obligatoriu. Frotiul direct colorat arată bacili Gram-negativ. Izolarea shigelelor se face pe medii diferenţiale şi, preferabil, selective: mediul „S—S" (*Shigella-Salmonella*) şi mediul Istrate-Meitert, cel mai frecvent folosit în ţară noastră. Suspensia de materii fecale sau mucozităţi spălate cu soluţie clorurosodică 8,5‰ se însămînţează, prin epuizare, pe plăci Petri care conţin mediile de mai sus. Pe mediul Istrate-Meitert coloniile de bacili dizenterici nu modifică aspectul mediului. Întrucît un criteriu important de diferenţiere de salmonele este mobilitatea, trebuie stabilită imobilitatea bacilului în cauză, prin examen între lamă şi lamelă sau, mai bine, prin însămînţare pe suprafaţa unui tub cu geloză moale 0,5 % sau mediul special pentru mobilitate Tittscler-Sandholzer (microbii mobili invadează geloza pînă la fundul tubului, pe cînd bacilii dizenterici, fiind imobili, cresc numai la suprafaţa mediului).

Diagnosticul de certitudine se realizează prin identificarea serologică a shigelelor. Bacilii dizenterici fiind microbi imobili, deci lipsiţi de aparat ciliar, structura lor antigenică este alcătuită exclusiv din antigene somatice de constituţie glucido-lipido-polipeptidică. În timp ce tipurile de bacili dizenterici din grupul A şi C sînt omogene, stabile şi bine individualizate din punct de vedere antigenic, la shigelele din grupul B se remarcă prezenţa multor fracţiuni antigenice comune, care determină o strînsă înrudire antigenică a tipurilor şi subtipurilor acestui grup, ceea ce determină dificultăţi în identificarea serologică.

Tehnica identificării serologice este următoarea: cu un dermatograf însemnăm, pe dosul plăcii cu mediul Istrate-Meitert, coloniile izolate de cercetat. Aceste colonii se pot cerceta pentru orientare rapidă direct prin aglutinare cu serurile specifice antidizenterice. Deoarece uneori bila din mediul Istrate-Meitert poate modifica structura antigenică a tulpinii de cercetat, este preferabil să trecem fiecare colonie pe un tub cu geloză înclinată şi după 18—20 de ore de creştere la termostat să efectuăm identificarea prin aglutinare pe lamă; în cazurile dubioase se efectuează o suspensie în soluţie clorurosodică 8,5‰ care se fierbe timp de o oră, şi apoi se reiau încercările de identificare serologică prin aglutinare. Această precauţie este necesară, deoarece adeseori serurile imune antidizenterice nu aglutinează decît tulpinile cărora li s-au distrus antigenele de suprafaţă, prin căldură.

Identificarea tulpinii microbiene izolate prin coprocultură se efectuează prin metoda aglutinării pe lamă şi prin aglutinare în tuburi.

I. *Aglutinarea pe lamă* se face folosind lame de sticlă curate şi degresate pe care se aşază o picătură de ser aglutinant din diluţia indicată pe fiola de ser şi o picătură din suspensia în soluţie clorurosodică 8,5‰, din cultura de pe geloza înclinată. Se amestecă picăturile cu ansa bacteriologică, flambată în prealabil şi se urmăreşte cu lupa apariţia aglutinării.

II. *Aglutinarea în tuburi*, se efectuează obligatoriu în cazul aglutinării pozitive pe lamă cu 2 sau mai multe seruri aglutinante. Se efectuează o suspensie bacteriană din tulpina de cercetat cu o concentrație de 500—600 milioane de bacterii pe ml după scara nefelometrică Brown. Se efectuează o serie de diluții binare succesive din serul aglutinant pînă la titrul limită al serului și se repartizează cîte 0,5 ml din fiecare diluție într-o serie de tuburi de aglutinare curate și sterile. Se adaugă în fiecare tub cu diluție de ser, 0,5 ml din suspensia bacteriană a tulpinii de cercetat și se amestecă prin aspirație cu o pipetă Pasteur de la diluția cea mai mare spre cea mai mică.

Citirea reacției de aglutinare în tuburi se face la aglutinoscop, după o incubație de 2 ore la 37° și 20 de ore la temperatura camerei.

Pentru ca o seroreacție de aglutinare în tuburi să fie considerată pozitivă, aglutinarea, trebuie să fie prezentă cel puțin pînă la jumătatea titrului serului aglutinat indicat pe fiolă.

Identificarea serologică a unei tulpini de *Shigella* se face cu următoarele seruri aglutinante antidizenterice, pe care le folosim în ordinea frecvenței în țara noastră a grupurilor de *Shigella :*

1. Aglutinare pe lamă cu ser polivalent Flexner
2. Aglutinare pe lamă cu ser anti-Sonne „S" și anti-Sonne „R"
3. Aglutinare pe lamă cu ser anti-*Shigella Shigae*
4. Aglutinare pe lamă cu ser polivalent *Sh. Boydii*
5. Aglutinare pe lamă cu ser polivalent *Large-Sachs* (3—7)
6. Aglutinare pe lamă cu ser anti-*Schmitz.*

Toate serurile antidizenterice au indicate pe fiolă titrul aglutinant pentru aglutinarea pe lamă și titrul aglutinant pentru aglutinarea în tuburi.

Datorită structurii antigenice complexe a grupului Flexner, reacțiile de identificare serologică a tipurilor și subtipurilor din interiorul acestui grup nu se pot efectua decît folosind seruri aglutinante adsorbite de tip și de grup. Întrucît în țara noastră cele mai răspîndite shigele sînt cele din grupul Flexner, prezentăm îndrumările Institutului „Dr. I. Cantacuzino" pentru efectuarea identificărilor serologice în cadrul grupului Flexner :

Schema tipurilor B. Flexner
(Nomenclatura internațională O.M.S.)

Tipul	Antigene de tip	Antigene de grup
1 a	I	1, 2, 4, 5, 9
1 b	I, S	1, 2, 4, 5, 6, 9
2 a	II	1, (3, 4) *
2 b	II	1, 7, 8, 9
3_1	III	1, 3, 4 (6)
3_2	III	1, 6, 7, 8, 9
4 a faza specifică	K,/IV_1, (IV_2)/	1, (3, 4)
4 a faza nespecifică	IV_1, IV_2	1, (3, 4)
4 b	IV_2	1, 6
4 c	IV_1, IV_3	1, 7, 8, 9
5 (× plus)	V	1, 5, 7, 9
5 (× minus)	V	1, 5
6	VI	1, 2, 4
Varianta tip X		1, (3, 4), 7, 8, 9
Varianta tip Y		1, 3, 4

* Paranteza indică prezența facultativă a unor antigene.

Serurile aglutinante anti-Flexner adsorbite, de tip și de grup, sînt seruri de iepuri imunizați intravenos cu bacili Flexner vii sau omorîți prin căldură, din care au fost îndepărtate prin adsorbție aglutininele celorlalte tipuri (grupuri).

Serurile de tip sînt notate astfel : I, II, III, IV_1, IV_2, IV_3, V, VI, S, K.

Serurile de grup : 6 ; 3,4 ; 7,8 ; 7,8,9.

Serurile adsorbite se întrebuințează nediluate, numai pentru aglutinarea pe lamă.

Aglutinarea se face cu suspensii din culturi de 18—20 de ore. Aglutinarea apare de obicei imediat, mai rar după 1—4 minute.

Structura antigenică a tulpinilor de B. Flexner se stabilește astfel conform schemei alăturate : tulpinile —care au aglutinat cu serul polivalent anti-Flexner — se cercetează față de serurile de tip în ordinea următoare : II (deoarece tipul 2 a se găsește mai frecvent în R.P.R.), I (din care predomină la noi 1 b), III (predomină 3_2), K, IV_1, IV_2, IV_3, V, VI. În cazul aglutinării pozitive cu unul din serurile de tip, precizarea tipului de B.Flexner se face , în continuare, cu serurile de grup corespunzătoare din schemă. Exemplu : dacă aglutinează cu ser de tip I, se trece la aglutinarea cu serul de grup 6, pentru a stabili dacă este 1 a sau 1 b. Dacă aglutinează cu serul de tip II, se încearcă aglutinarea cu serul de grup 3, 4 și 7, 8 (9), pentru a stabili dacă este 2 a sau 2 b.

Tulpinile X și *Y* nu conțin antigene de tip, ci numai de grup ; de aceea sînt aglutinate numai de serurile de grup (X : 7,8, 9, deseori și 3,4; y : 3,4).

Există variante de bacili Flexner care nu pot fi încadrate în nomenclatura internațională. Aceste tulpini se definesc prin antigenele de tip și de grup pe care le posedă (ex.: B. Flexner cu antigen de tip II și de grup 6 etc.).

Stabilirea structurii antigenice a unei tulpini care a aglutinat cu serul poli-Flexner poate începe și invers, mai întîi prin aglutinarea cu serurile de grup, pentru ca diferențierea să se facă ulterior prin serurile de tip.

Există tulpini din grupul coliform cu antigene comune bacililor Flexner, care deci aglutinează cu serul poli-Flexner. Specificitatea mărită a serurilor adsorbite reduce erorile de diagnostic și ușurează cercetarea caracterelor biochimice după Edwards și Ewing care sînt de neînlocuit pentru caracterizarea completă a unei tulpini de *Shigella*.

Serodiagnosticul, prin cercetarea prezenței aglutininelor antidizenterice în serul bolnavilor, este foarte rar utilizat și are mai mult o valoare retrospectivă, în cazul unei epidemii de dizenterie într-o regiune pînă atunci indemnă. Serodiagnosticul întîmpină mari dificultăți de interpretare în zonele de endemie dizenterică, datorită aglutininelor normale care apar la indivizii aparent sănătoși, prin imunizări anterioare oculte. Aglutininele specifice apar între a 7-a și a 15-a zi de la începutul bolii, se mențin în convalescență și scad după cîteva luni. Serodiagnosticul la bolnav are valoare numai atunci cînd aglutininele sînt urmărite în mod dinamic și se constată creșterea lor progresivă, aceasta, deoarece titrul aglutininelor antidizenterice la indivizii normali este destul de ridicat. Excepție la această constatare o face *Shigella sonnei*; pentru acest microb nu există aglutinine normale, așa că, în cazul îmbolnăvirii cu *Sh. sonnei*, serodiagnosticul poate fi utilizat cu mai multă siguranță. Aglutininele antidizenterice mai pot fi puse în evidență și în materiile fecale, filtrînd fecalele prin hîrtie de filtru. Metoda evidențierii coproaglutininelor este însă mai puțin utilizată, în ultimul timp dovedindu-se că are o specificitate redusă.

Imunitate

Reîmbolnăvirea cu bacilii dizenterici apare foarte frecvent. Problema dacă reîmbolnăvirile sînt produse de alte tipuri de shigele decît cel inițial nu este pe deplin rezolvată. După toate probabilitățile, imunitatea dată de boală, exceptînd dizenteria cu *Shigella shigae* este de scurtă durată.

Sensibilitatea la antibiotice și chimioterapice

În cazurile de dizenterie acută, bacilii dizenterici fiind în primul rînd sensibili la antibiotice, ca cloramfenicol și tetraciclinele, se va folosi un tratament cu cloramfenicol sau tetraciclină (hostaciclină), oxitetraciclină (teramicină) și clortetraciclină (aureomicină). Chimioterapia cu sulfamide, folosită cu succes înaintea antibioticelor, se asociază astăzi din ce în ce mai rar. În cazurile grave de dizenterie cu *b. Grigoriev-Shiga*, care în țara noastră sînt din ce în ce mai rare, se poate recurge și la tratamentul cît mai precoce cu ser antidizenteric (ser antitoxic și antimicrobian). În cazurile de dizenterie cronică, tratamentul etiologic este dificil de aplicat și se bazează, în primul rînd, pe testarea sensibilității la antibiotice și chimioterapice a tulpinii izolate de la bolnav. Se folosește antibioticul față de care tulpina de *Shigella* s-a dovedit mai sensibilă sau se asociază 2—3 antibiotice active.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU SHIGELLA

Schema de diagnostic

Produs patologic: conținut intestinal

— Examen direct între lamă și lamelă și a unui frotiu colorat Gram a unei porțiuni mucopurulente din produsul patologic pentru orientare asupra florei bacteriene și celulelor. Nu este obligatoriu.

— Efectuarea unei suspensii în soluție clorurosodică 8,5 ‰ dintr-o porțiune mucopurulentă a materiilor fecale și însămînțare prin tehnica epuizării ansei pe plăci Petri cu mediul Istrate-Meitert sau *Shigella-Salmonella*.

— Se controlează macroscopic apariția, forma și aspectul coloniilor izolate și microscopic prin frotiu colorat Gram. Coloniile de *Shigella* pe mediul Istrate-Meitert sînt mici, semitransparente, netede cu marginile regulate și nu modifică culoarea mediului. Dintr-o colonie izolată tipică se fac următoarele subculturi:

↓ Pe geloză înclinată, pentru identificarea serologică

↓ Pe geloză moale 0,5 % sau Tittsler-Sandholzer, pentru cercetarea mobilității

↓ Pe bulion, pentru testarea sensibilității la antibiotice

– Controlul mediului pentru mobilitate. Shigelele sînt imobile şi nu difuzează în geloza moale sau mediul Tittsler-Sandholzer.

– Însămînţarea din cultură în bulion, în pînză pe o placă Petri cu geloză, după tehnica testării sensibilităţii prin metoda difuzimetrică cu pulberi de antibiotice. Între antibioticele folosite este obligatoriu să includem cloramfenicolul şi clortetraciclina.

– Din cultura pe geloză înclinată de 18–20 de ore, se efectuează identificarea serologică pe lamă cu serurile aglutinante anti-*Shigella* în ordinea următoare :

1. Aglutinarea cu serul polivalent Flexner
2. Aglutinare cu serurile anti-Sonne „S" şi anti-Sonne „R"
3. Aglutinare cu serul *Shigella shigae*
4. Aglutinare cu serul polivalent *Sh. Boydii*
5. Aglutinare cu serul polivalent anti-Large-Sachs (3–7)
6. Aglutinare cu serul anti-Schmitz

– Se completează cu aglutinarea în tuburi, cînd tulpina este aglutinată pe lamă de 2 sau mai multe seruri.

– Se fac următoarele însămînţări pentru completarea diagnosticului prin caracterele biochimice, după Edwards şi Ewing.

Fermentarea manitei şi lactozei.

Testul indologenezei în apă peptonată.

– Se eliberează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, biochimice şi antigenice ale tulpinei izolate şi se indică spectrul sensibilităţii la antibiotice.

BIBLIOGRAFIE

BALŞ M., MEITERT EUGENIA — Studiu comparativ, experimental şi practic al valorii mai multor lichide de conservare pentru salmonele şi bacili dizenterici, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1959, nr. 1, p. 71–78.

BALŞ M., HORODNICEANU T., şi colab. — Contribuţii la studiul bacteriologic al unor tulpini de *Shigella Boydii*, *Microbiologia*, (*Bucureşti*), 1959, nr. 4, p. 315–320.

BOÉR LASZLO — Rezultatele cercetărilor noastre pentru ameliorarea diagnosticului etiologic al dizenteriei bacilare şi pentru depistarea purtătorilor de germeni *Microbiologia*, (*Bucureşti*), 1957, nr. 4, p. 334–336.

BERCOVICI C., BEŞLEAGĂ V., IOSUB C., OLINICI N., TRIFAN C., POPA S. — Consideraţii asupra tulpinilor de b. dizenterici din grupul Large-Sachs izolate în Moldova, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1961, nr. 3, p. 263–266.

CHEEVER F. S. — Bacterial and mycotic infections of man — Dubos R., ed. a 2-a, Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 437–450.

CHUKHLOVIN B. A., KUDRIAVTSEV M. G. — Asupra diagnosticului bacteriologic al dizenteriei, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1961, nr. 2, p. 127–139.

DUMAS J. — Bactériologie médicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 435–451.

GASPARIAN N. A. — Diagnosticul dizenteriei cronice printr-o metodă complexă de laborator, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1957, nr. 9, p. 78.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ediţia a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 459–483.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 135–143.

IAVRUMOV V. A. — Îmbunătăţirea tehnicii diagnosticului bacteriologic în investigaţiile asupra dizenteriei în colectivităţi, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1957, nr. 12, p. 24–26.

IDINA M. S. — Cu privire la durata supravieţuirii bacililor dizenterici în materiile fecale, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1959, nr. 12. Din „Probleme de microbiologie din literatura sovietică de specialitate", Acad. R.P.R., *Inst. Stud. rom.-sov.*, 1960, nr. 3, p. 79–87.

ISTRATE G., MEITERT T. — Date de actualitate în dizenteria bacilară, *Microbiologia*, (*Bucureşti*), 1961, nr. 3, p. 231–246.

ISTRATE G., IVAN I., MEITERT T., GOREA A. — Despre diagnosticul serologic al infecţiilor cu *Shigella Sonnei*. Metodă simplă pentru înlăturarea erorilor, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1956, nr. 1, p. 42–50.

ISTRATE G., NEGRU FLORICA, MEITERT T. — Contribuţii la studiul reacţiilor de coproaglutinare şi de precipitare cu hapteni în diagnosticul dizenteriei, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1957, nr. 6, p. 501–511.

IVANOV A. I. — Reacţia de fixare a complementului în diagnosticul formelor recurente şi cronice de dizenterie bacteriană, *Ž. Mikrobiol. Mosk.*, 1957, nr. 3, p. 82–86.

JELEZKO K. V. — Studiul unor antigene noi pentru reacţii de diagnostic cutanate în diferite forme de dizenterie, *Sovetsk. Med.*, 1960, nr. 2, În „Probleme de microbiologie etc. din literatura sovietică de specialitate", Acad. R.P.R., *Inst. Stud. rom.-sov.*, 1960, nr. 3, p. 88–94.

KARATZ K. S. — Interrelaţii între diferitele specii de bacili dizenterici, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1959, nr. 8, p. 115–116.

KOLMER J., BOERNGER F. — Approved laboratory, techniques., ed. a 4-a, Ed. Appleton-Century, New York 1945, p. 475–476.

KOLMER J. A. — Clinical diagnosis by laboratory examinations, ed. I, Ed. Appleton-Century, New York, 1944, p. 942–943.

LEONESCU M., HORODNICEANU THEA — Valoarea fagodiagnosticului în dizenterie, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1961, nr. 3, p. 271–277.

MARGORINA L. M., MAKAROVA M. A. — Semnificaţia formelor atipice ale bacteriilor în epidemiologia dizenteriei, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1959, nr. 7, p. 27–34.

MACKIE J., MC CARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingston, Edinburgh, 1956, p. 453–458.

MEITERT T., MEITERT EUGENIA — Cercetări romîneşti în dizenteria bacilară, *Microbiologia*, (*Bucureşti*), 1961, nr. 3, p. 193–230.

NESTORESCU N., POPOVICI MARCELA — Bacteriologie medicală, (sub. red. prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 411–423.

NOVGORODSKAYA E. M. — Unele considerații asupra problemei clasificării bacililor dizenterici, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1959, nr. 4, p. 9—19.

OLINICI N., GOREA A. — Toxicitatea tulpinilor de *Shigella disenteriae* I (*B. Shiga*) și reacția de precipitare în gel, *Microbiologia, (București)*, 1959, nr. 3, p. 219—224.

OSTROVKHOVA N. P., VOLOSTNYIKH A. V., GRECHUSHKINA A. G., BAUMANOSKAIA A. P., MESCHERYAKOVA Z. P. — Metode suplimentare pentru diagnosticul de laborator al dizenteriei bacteriene, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1958, nr. 2, p. 92—95.

RAVICI E. D., BIRGHER O. G. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecțioase, G. J. Sinai și O. G. Birgher, Ed. de stat pentru lit. științifică, București, 1952 (traducere din limba rusă), p. 324—346.

ROSTAPSHOV M. F. — Titrul complementului și reacția de aglutinare la bolnavii de dizenterie tratați cu antibiotice, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1958, nr. 2, p. 89—92.

SERGPRENNIKOVA V. I., PONOMAREVA G. E., POCINOK P. I., ZARIȚKI A. M. — Despre purtătorii sănătoși de bacili dizenterici, *Sovelsk. Med.*, 1960, nr. 2. Din ,,Probl. de Pat. Inf. din lit. sov. de spec., Acad. R.P.R., *I.S.R.S.*, 1960, nr. 3, p. 102—112.

SIROKO I. A. — Keratoconjunctivita la cobai ca biotest în identificarea bacililor dizenterici, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1958, nr. 4, p. 71—77.

SOLOMIN N. N. — Unele probleme ale dizenteriei ținînd seama de variabilitatea agenților săi cauzali, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1958, nr. 2, p. 118.

STOVBUN F. J., KALINA A. P., BRYIZGUNOVA E. V. — Dinamica modificărilor în situația microflorei intestinale în dizenterie și afecțiuni dizenteriforme la copii, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1958, nr. 2, p. 112.

STITT E. R. ,CLOUGH P. W., BRANHAM S. E. — Practical Bacteriology, Hematology and Parasitology, ed. a 10-a, Ed. Blakiston, New-York, 1948, p. 133—138.

THOMPSON R. V. — Microbiology and Epidemiology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Londra, 1958, p. 357—358.

TOPLEY and WILSON'S — Principles of Bacteriology and Immunity, ed. a 4-a, Ed. Edward Arnold, Londra, 1955, vol. I, p. 784—800; vol. II, p. 1 760—1 773.

VOICULESCU M., IONESCU G., VALERIU ANA, HORODNICEANU THEA — Afecțiuni severe și mortale cauzate de *Sh. Sonnei*, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1959, nr. 7 p. 57—60.

WHITBY L., HYNES M. — Medical Bacteriology, ed. a 6-a, Ed. Churchill Londra, 1956, p. 206—212.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, partea I, p. 443—462.

ZINSSER H. — Textbook of bacteriology, ed. a 11-a, Ed. Appeleton-Century-Crofts, New-York, 1957, p. 397—405.

ZWEREV E. J. — Dizenteria actuală și bolile intestinale înrudite. *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1960, nr. 1. Din ,,Probl. de Pat. Inf. din lit. sov. de spec." ,,Acad. R.P.R., *I.S.R.S.*, 1960, nr. 3, p. 113 — 122.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HOLEREI

Familia: *Vibrionaceae*. Genul: *Vibrio*. Specia tip: *Vibrio comma*

Generalități

Genul *Vibrio* cuprinde o serie de microbi, foarte mobili, în formă de virgulă, gram-negativi, aerobi, nesporulați, fără capsulă, în cea mai mare parte saprofiți acvatici. Numai un număr mic de specii sînt patogene.

Specia tip este reprezentată de vibrionul holerei sau *Vibrio comma*, descoperit în 1883, de către Robert Koch, în cursul unei epidemii de holeră în Egipt. În afara vibrionului holeric autentic, agentul etiologic al holerei, se întîlnesc în natură o serie de vibrioni patogeni foarte asemănători cu *Vibrio comma*, dar care provoacă la om afecțiuni enterice de o gravitate mai mică, care au fost denumite, în 1949, după terminologia O.M.S., sindroame paraholerice sau holeriforme. Printre cei mai cunoscuți vibrioni holeriformi sînt: *Vibrio mecinicovii*, *Vibrio denekeii*, *Vibrio finkler-prier* și *Vibrio el Tor*. Vibrionii holeriformi se întîlnesc frecvent în zonele endemice de holeră și în perioadele interepidemice, ceea ce a dus la ipoteza că vibrionii holeriformi sînt în realitate variante ale vibrionului holeric.

Boala la om

Holera este o boală infecțioasă epidemică, cu o incubație foarte scurtă, de la cîteva ore, la 4—5 zile maximum. Începutul bolii este brusc, se manifestă printr-o bradicardie marcată și se caracterizează prin vărsături, crampe abdominale, hipotermie, tenesme și scaune diareice frecvente. Enterita holerică are un caracter special, prin faptul că scaunele au aspectul de apă de orez, cu numeroase conglomerate de mucus, denumite ,,granule riziforme”, care conțin numeroși vibrioni holerici. Datorită scaunelor apoase frecvente, organismul se deshidratează, ceea ce se traduce prin apariția hipotermiei și anuriei. Discrepanța dintre hipotermia perifică, care ajunge la 35°, însoțită de cianoza extremităților și temperatura centrală a organismului, care se menține în jurul a 37°, a fost denumită stare de ,,algiditate holerică” și traduce o intoxicație gravă a bolnavului. Leziunile locale determinate de vibrionul holeric se găsesc la nivelul intestinului subțire, a cărui mucoasă este hiperemiată, de culoare roșie vișinie, cu pete hemoragice.

Morfologie și caractere de cultură

Vibrionul holeric este un microb de 2×0,4 μ, ușor incurbat cu aspect de virgulă. Microbul manifestă însă, un marcat polimorfism și în aceeași cultură, alături de formele clasice de bacil în virgulă găsim numeroase forme rotunjite și cocobacilare. Microbul este foarte mobil, datorită prezenței unui cil terminal. Se colorează cu toți coloranții de anilină și este gram-negativ. În mod obișnuit se recomandă colorarea cu fucsină Ziehl, diluată 1/10.

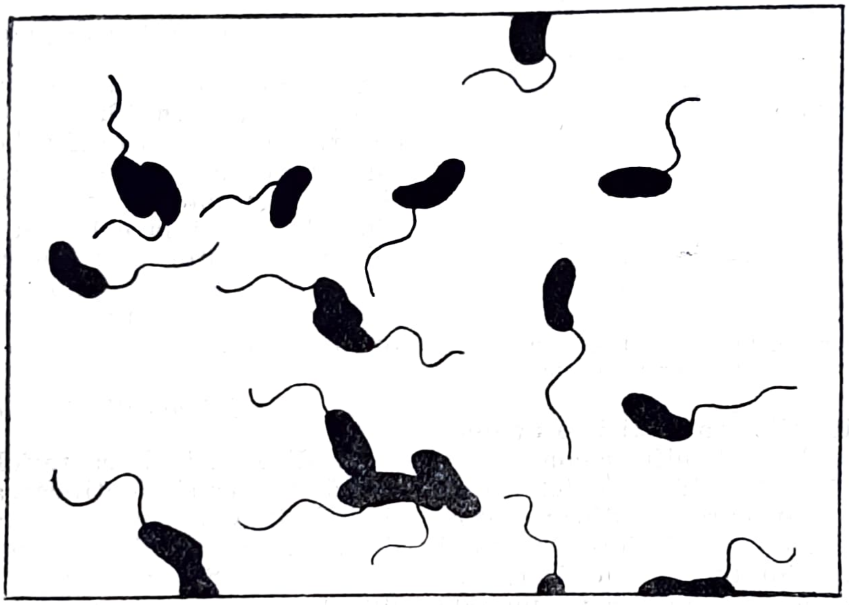


Fig. 337. — Vibrio comma. Desen după un frotiu din cultură pe apă peptonată (× 3 000).

Caractere de cultură și biochimice

Crește pe mediile de cultură uzuale, în condiții de aerobioză și microaerofilie. Mediile lichide și solide, puternic alcalinizate la pH între 7,5 și 9,2, reprezintă condiții elective de creștere pentru vibrionul holeric.

Mediile clasice, apa peptonată alcalină și mediul solid Dieudonné (geloză, sînge defibrinat și hidrat de K), folosite în trecut pentru izolarea vibrionului holeric, sînt astăzi înlocuite treptat cu medii speciale de izolare și diagnostic, care toate însă își păstrează caracterul de alcalinitate.

Mediile de îmbogățire și izolare cele mai folosite sînt: apă peptonată 1% cu NaCl 0,5%, la pH=9,2; apă peptonată cu sulfat de bismut la pH=9,1, după Read; apă peptonată cu taurocolat de Na și telurit de K la pH=9. Acest din urmă mediu a fost folosit cu mare eficacitate de Gohar, în epidemia de holeră din Egipt, în 1947.

Mediile de diagnostic sînt, fie selective, fie diferențiale, pentru a evidenția anumite proprietăți biochimice. Mediul geloză nutritivă, cu adaos de taurocolat de Na 0,5% la un pH=8, este satisfăcător. Dacă creșterea bacilului proteu stinghereşte, se poate mări concentrația de taurocolat de Na de la 0,5 pînă la 1%.

Mediul Aronson este un mediu solid, de tip agar-Endo alcalinizat, la care se înglobează zaharoză și servește astfel la evidențierea caracterelor biochimice.

Vibrionul holeric are un echipament enzimatic complex și fermentează o serie de zaharuri, fără producere de gaze. Din punctul de vedere al diagnosticului ne interesează următoarele caractere biochimice: fermentarea zaharozei, manozei și arabinozei. Vibrionul holeric autentic fermentează numai zaharoza și manoza. Producerea de indol în apa peptonată și transformarea nitraților în nitriți se evidențiază prin adăugarea de acid sulfuric concentrat într-o cultură în apă peptonată, care determină apariția unei culori roșii caracteristice: *cholera rot*. Reacția a fost denumită indol-nitroasă și este caracteristică vibrionului holeric. Hemoliza și hemodigestia servesc de asemenea ca metodă de diferențiere biochimică. Vibrionul holeric nu produce hemoliză, nici în mediu lichid, nici pe mediu solid. Microbii holeriformi produc hemoliză. Pe mediile solide cu sînge de oaie 5% coloniile de vibrion holeric dezvoltă în jur un halo verzui, datorită digerării pigmentului sanguin și transformării hemoglobinei în hematină. Această hemodigestie nu constituie un caracter constant la toți vibrionii holerici. Acțiunea vibrionilor asupra glucidelor se mai evidențiază și prin reacția Voges-Proskauer. Vibrionul holeric dă reacția Voges-Proskauer negativă, pe cînd vibrionii holeriformi formează acetil-metil-carbinol din glucoză și dau reacția pozitivă.

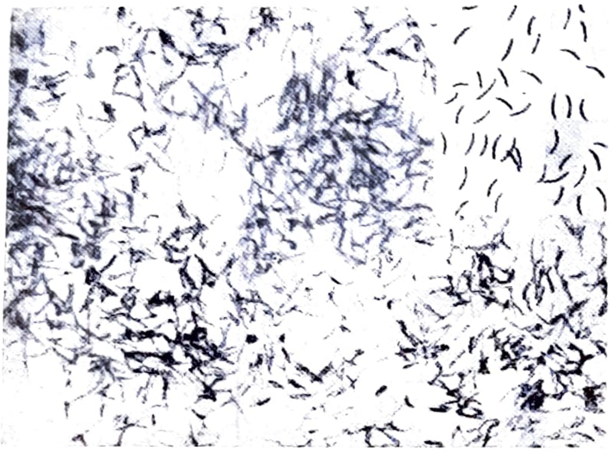


Fig. 338. — *Vibrio comma.* Frotiu dintr-o cultură de 8 ore pe apă peptonată (colorație Gram).

Structură antigenică

La vibrionul holeric se constată un antigen O somatic, termostabil, și un antigen H flagelar, termolabil. Antigenul O este specific, pe cînd antigenul H este comun vibrionului holeric și vibrionilor holeriformi. Formele „R" de vibrion holeric nu posedă decît antigen H. Serurile aglutinante antiholerice se prepară numai cu antigenul O din culturi „S". Din punct de vedere serologic, se cunosc astăzi 3 tipuri de vibrioni holerici:

— tipul Inaba, reprezintă vibrionul holeric cel mai virulent;

— tipul Ogawa, un vibrion puțin virulent;

— tipul Hikojima, un vibrion cu caractere de virulență intermediară.

Caractere de patogenitate

Simptomatologia holerei arată că boala este o toxiinfecție. În 1892, P. I. Gamaleia a descoperit toxina vibrionului holeric și a arătat că este compusă din doi factori, unul termostabil și altul termolabil, avînd caracter de endotoxină. Injectată la cobai în doză de 0,25 g pe cale intraperitoneală, determină simptome de intoxicație, care se manifestă prin hipotermie, paralizia membrelor posterioare, diaree și moarte în 24 de ore.

Diagnosticul de laborator

În diagnosticul bacteriologic al holerei se caută izolarea și identificarea vibrionului holeric de la bolnavi și suspecți, iar în caz de epidemii, de la cadavre și din apă, pentru a stabili sursa de infecție. Se folosesc, în acest scop, metode directe și metode indirecte.

A. Metode directe. Examenul constă în cercetarea agentului patogen în produsele patologice prin frotiu direct și prin însămînțări pe medii de îmbogățire și selective; microbul izolat va fi identificat pe baza proprietăților morfologice, de cultură, biochimice, serologice și prin fenomenul Pfeiffer-Isaev.

Produsele patologice în care se va căuta prezența vibrionului holeric vor fi, la bolnav, materiile fecale și mai rar vărsăturile. La suspecți, materiile fecale vor fi recoltate cu sonda sau după o prealabilă purgație cu ulei de ricină. La cadavru se vor folosi conținutul intestinal și produsul raclat cu ansa de pe mucoasa congestionată a intestinului.

La bolnav, scaunele caracteristice pot constitui o indicație de diagnostic; caracterul apos, cu conținut de granule riziforme, formate din descuamații ale mucoasei intestinului, se va cerceta totdeauna.

Dintr-o granulă riziformă se va face un preparat între lamă și lamelă și un frotiu colorat cu fucsină fenicată sau prin metoda Gram. Se va constata prezenţa unui microb foarte mobil, gram-negativ, cu aspectul de virgulă. Examenul direct va fi completat prin însămînţări pe medii de îmbogăţire : apă peptonată alcalinizată, pH 9 – 9,2. În acest mediu, prin faptul că vibrionii holerici sînt aerobi obligatoriu, vor cultiva abundent în interval de 6 ore, formînd un văl la suprafaţa mediului. Ceilalţi microbi din flora intestinală vor fi inhibaţi parţial în dezvoltarea lor, datorită alcalinităţii mediului şi vor cultiva mai tîrziu, datorită faptului că apa peptonată este un mediu mai sărac în principii nutritive. După 6 ore de incubaţie la 37° cultura va fi examinată la microscop. Din vălul de la suprafaţa mediului se va face un preparat umed şi un frotiu colorat cu fucsină Ziehl, diluată 1/10. Se va constata prezenţa unui microb cu aceleaşi caractere mobile, gram-negativ, în formă de virgulă. Deşi vălul care se dezvoltă la suprafaţa apei peptonate nu conţine vibrioni holerici în cultură pură, putem efectua o reacţie orientativă de microaglutinare pe lamă cu ser antiholeric monovalent A. Această metodă constituie un mijloc de diagnostic rapid al holerei, dar trebuie confirmat ulterior prin testele complete de diagnostic efectuate cu tulpina izolată în cultură pură.

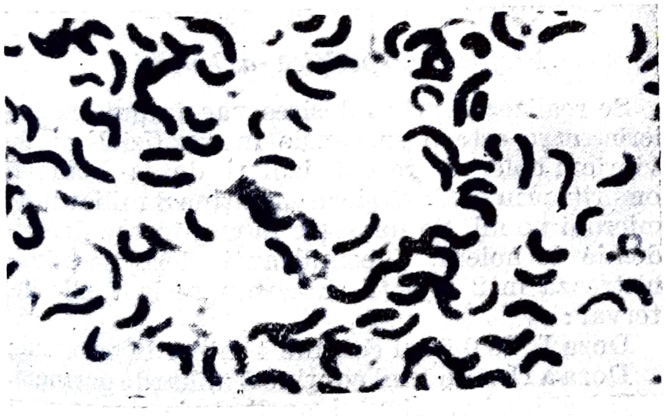


Fig. 339. — *Vibrio aquatilis* — Vibrion acvatic saprofit, identic morfologic cu *Vibrio comma* (coloraţie Gram).

Din această cultură se va lua o ansă din vălul de la suprafaţă şi se vor face dispersii cu ansa pe medii solide selective sau în lipsă, pe mediul Dieudonné sau geloză înclinată, pentru a obţine colonii izolate.

După însămînţare, mediile solide vor fi ţinute, timp de 8 ore, la incubat la 37°, după care se va controla cultura, pentru a vedea dacă microbul s-a izolat în colonii pure.

Pe geloză înclinată vibrionul holeric cultivă în 6 – 8 ore, sub forma unor colonii rotunde, mici, transparente.

Microbul astfel izolat va fi identificat prin aglutinare cu serul specific antiholeric şi prin fenomenul de vibrioliză Pfeiffer-Isaev. Pentru completarea datelor, în scopul diagnosticului, se vor cerceta şi caracterele biochimice, după schema din tabelul 121.

TABELUL 121

	Fermentarea			Reacţia indol-nitroasă	Reacţia Voges-Proskauer	Hemoliza
	Zaharozei	Manozei	Arabinozei			
Vibrion holeric	+	+	−	+	−	−
Vibrioni holeriformi	+	+	+	−	+	+

Pentru identificarea prin reacţia de aglutinare se vor întrebuinţa o suspensie în ser fiziologic dintr-o cultură de 24 de ore a tulpinii de cercetat şi seruri aglutinante O specifice antiholerice, cu un titru 1/5 000.

Fenomenul de vibrioliză Pfeiffer-Isaev constituie un procedeu sigur de identificare a vibrionilor holerici, care sînt mai întîi aglutinaţi şi apoi lizaţi de serul specific antiholeric în prezenţa alexinei. Reacţia se execută pentru diagnostic numai *in vivo*, pentru că realizează simultan şi infecţia experimentală.

Reacţia in vivo. Se iau 2 cobai, dintre care unul normal şi altul imunizat activ sau pasiv contra holerei. La ambii cobai se inoculează intraperitoneal 1 ml, dintr-o suspensie în ser fiziologic din cultura pură a tulpinii de cercetat. După intervale de 10—20—40 şi 60 de minute de la inoculare, se va puncţiona cavitatea peritoneală la ambii cobai cu o pipetă Pasteur efilată. Exsudatul peritoneal obţinut va fi examinat între lamă şi lamelă şi în frotiu colorat cu fucsină diluată 1/10.

La cobaiul neimunizat se va constata că vibrionii sînt foarte mobili şi de la un interval de timp la altul se înmulţesc foarte mult. Totodată, se constată formarea unui exsudat inflamator conţinînd un mare aflux de leucocite polimorfonucleare. La 24 de ore cobaiul moare prin intoxicaţie acută holerică. La cobaiul imunizat, în caz că există un vibrion holeric, se va constata că vibronii îşi pierd din mobilitate, nu se mai înmulţesc, devin mai puţin refringenţi,

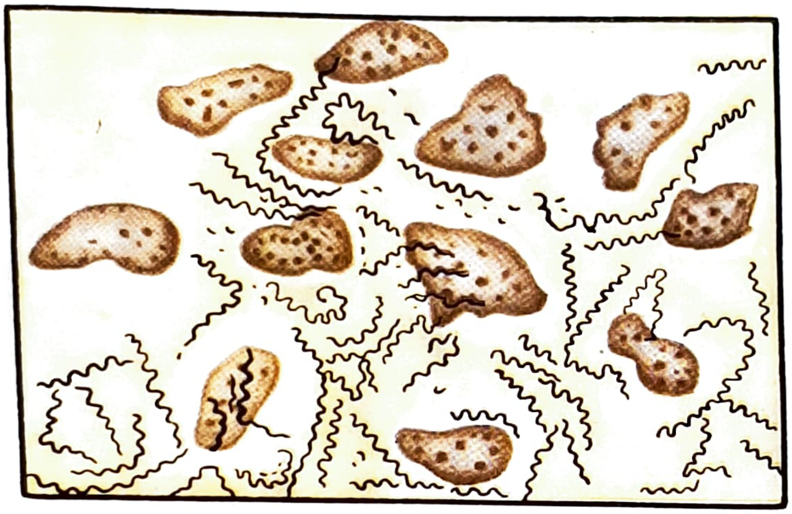


Fig. 340. — *Treponema pallidum*. Secţiune de organ de la un făt sifilitic (coloraţie Levaditi-Manuelian).

se colorează mai greu, apoi se imobilizează, se strîng în grămezi și se aglutinează. Ulterior, vibrionii sînt transformați în granule, din care parte sînt fagocitate, parte sînt lizate de alexină.

A. **Metode indirecte.** O metodă simplă indirectă este cercetarea indolului în materiile fecale ale bolnavului sau suspectului. Pentru că uneori indolul este în cantitate mică în suspensia de fecale, pentru a-l evidenția adăugăm nitriți și apoi acid sulfuric și obținem o reacție pozitivă indol-nitroasă, de culoare roșie-violacee, caracteristică. Punerea în evidență a aglutininelor antiholerice în serul bolnavilor constituie o metodă complementară, cu valoare mai mult de diagnostic retrospectiv, întrucît apariția aglutininelor în sînge este tardivă.

Metode accelerate de diagnostic al holerei. ***Metoda Z. V. Ermolieva.*** **Pentru cercetarea produselor patologice provenite de la bolnav, produsul patologic este însămînțat în 3 eprubete: a) în prima se găsește apă peptonată; b) în a doua apă peptonată cu ser aglutinant antiholeric și c) în a treia, apă peptonată cu amidon 0,1%. După 3 ore de termostat, se examinează culturile. În eprubeta a doua, datorită serului aglutinant, pe măsură ce germenii se înmulțesc, vor fi aglutinați în flocoane care cad la fundul eprubetei. În a treia eprubetă se adaugă cîteva picături de Lugol; amidonul fiind digerat de un ferment specific al vibrionului holeric, cultura nu se va mai colora în albastru. Astfel, în 5—6 ore se poate pune diagnosticul de orientare care se completează prin izolarea în cultură pură și identificarea tulpinii de vibrion holeric.**

Cercetarea vibrionilor holerici la purtători

Holera fiind o boală epidemică cu extindere rapidă este necesar să se efectueze controlul bacteriologic al convalescenților și contacților cît mai repede și eficace.

Materiile fecale vor fi recoltate cu ajutorul unei sonde sau cu un tampon steril direct din rect. Însămînțarea se va face cît mai repede după recoltare. Cînd însămînțările nu se pot efectua imediat se folosesc soluții conservante.

Din tamponul cu conținut intestinal se efectuează o suspensie în 2—3 ml soluție cloruro-sodică 8,5‰ și se însămînțează 1 ml într-un flacon cu 30 ml apă peptonată alcalină. În același flacon se însămînțează cîte 10 recoltări simultan.

După 6—8 ore de incubație la 37° se examinează cultura pentru formarea vălului și controlul prezenței vibrionilor prin frotiu colorat cu fucsină diluată 1/10 și subculturi pe medii solide selective. Dacă după 6—8 ore sau în subculturi se constată prezența vibrionilor se vor face din nou recolte și însămînțări individuale de la cele 10 persoane suspecte. În caz contrar sînt considerate negative 10 recoltări dintr-o dată.

Cercetarea vibrionilor holerici în apa contaminată

Se folosește în acest scop apă peptonată alcalină concentrată 20‰. Într-un flacon steril de 1 500 ml cu 100 ml apă peptonată concentrată se însămînțează 1 litru din apa de cercetat. Se incubează la 37° și se examinează după 6—8 ore prin frotiuri și se fac subculturi pe medii selective. Un alt procedeu constă în filtrarea a cîtiva litri din apa de cercetat printr-un filtru Seitz și însămînțarea directă a rondelei filtrante în apă peptonată alcalină. După 6—8 ore se efectuează subculturi pe medii solide. La izolarea din apă, deoarece vibrionii sînt mai rari decît în produsele patologice, este necesar uneori, să se facă subculturi repetate pe medii de îmbogățire și apoi trecerile pentru izolare și identificare.

Profilaxia specifică a holerei

Se realizează prin folosirea vaccinului antiholeric, care este o suspensie în ser fiziologic de vibrioni holerici, recent izolați de la bolnavi, omorîți prin căldură și care conține 8 miliarde de microbi pe ml. Se folosește numai în caz de epidemie de holeră. Vaccinul antiholeric se administrează în 2 injecții subcutanate la 7 zile interval:

Doza I, de 0,5 ml conține 4 miliarde germeni;
Doza a II-a de 1 ml conține 8 miliarde germeni.

Injectarea vaccinului antiholeric poate provoca reacții locale (durere, roșeață, căldură și infiltrat) și generale (febră), care însă dispar după 24—48 de ore.

Eficacitatea vaccinării antiholerice, preconizată de Haffkine și Gamaleia, a fost dovedită de Ion Cantacuzino, care a vaccinat cu succes armata romînă în timpul războiului din 1913, în plină epidemie de holeră. Aceste încercări de vaccinare în masă au dovedit pentru prima dată, posibilitatea vaccinării în mediu epidemic și sînt cunoscute în literatura de specialitate sub numele de „Experiența romînească”.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HOLEREI

Schema A

Diagnosticul la bolnav și la cadavru

Produse patologice: conținut intestinal; fragmente de mucoasă intestinală, la cadavru

- Examen microscopic direct între lamă și lamelă a unei granule riziforme din conținutul intestinal și executarea a 2 frotiuri colorate cu fucsină fenicată diluată 1/10 și colorație Gram. Se va urmări prezența microbilor mobili, în formă de virgulă, gram-negativi.
  Examenul microscopic direct nu permite deosebirea vibrionului holeric de vibrionii holeriformi și are o valoare limitată de orientare.
- Însămînțare pe 2 tuburi cu apă peptonată alcalină sau pe apă peptonată cu taurocolat de Na și telurit de K. Se incubează la termostatul de 37°.
- După 6—12 ore se controlează culturile pentru creșterea caracteristică, exclusiv aerobă, sub formă de văl la suprafața lichidului. Din văl se efectuează următoarele operații:

  - Examen pentru mobilitate între lamă și lamelă. Frotiu colorat cu fucsină diluată 1/10.
  - Reacție de microaglutinare rapidă pe lamă cu serurile antiholeric adsorbit monovalent A.
  - Subculturi pe geloză cu taurocolat de Na și pe mediul Aronson.

- Se controlează macroscopic cu lupa pe mediile solide selective apariția coloniilor mici transparente, rotunde, izolate, de culoare roșie pe mediul Aronson. Se controlează microscopic coloniile izolate prin frotiu colorat cu fucsină diluată și se efectuează subculturi pe geloză înclinată și apă peptonată pentru obținerea tulpinii în cultură pură.
- Se controlează prin frotiu colorat cu fucsină diluată puritatea culturilor pe geloză înclinată și apă peptonată și se execută următoarele teste de identificare:

  - Fermentarea zaharozei, manozei și arabinozei.
  - Reacția indol nitroasă.
  - Reacția Voges-Proskauer.
  - Identificare serologică cu seruri aglutinante adsorbite de tip.
  - Fenomenul de vibrioliză pe cobai.

Se redactează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, biochimice, antigenice și de patogenitate ale tulpinii de vibrion izolată de la bolnav.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HOLEREI

Schema B

Diagnosticul stării de purtător

- Conținutul intestinal recoltat cu sonda sau cu un tampon steril din rect, se suspendă în 2—3 ml ser fiziologic steril. Din suspensia de cercetat se însămînțează imediat 1 ml într-un flacon cu 30 ml apă peptonată alcalină. În același flacon se însămînțează 20 de recoltări dintr-o dată.
- După 6—8 ore de incubație la 37° se examinează cultura pentru formarea vălului și controlul prezenței vibrionilor prin frotiuri colorate cu fucsină diluată 1/10. Din văl se efectuează subculturi pe medii solide selective.
- Se controlează macroscopic cu lupa subculturile pe mediile solide pentru apariția coloniilor rotunde, mici, transparente, de culoare roșie pe mediul Aronson.
- Coloniile izolate se controlează prin frotiu colorat cu fucsină și pentru mobilitate prin examen între lamă și lamelă.
- Din coloniile izolate caracteristice se efectuează subculturi pe geloză și apă peptonată pentru obținerea tulpinii în cultură pură în vederea identificării.
- Se controlează prin frotiu puritatea subculturilor pe geloză înclinată și apă peptonată și se execută următoarele teste de identificare:

  - Fermentarea zaharozei, manozei și arabinozei
  - Reacția indol nitroasă.
  - Reacția Voges-Proskauer.
  - Identificarea serologică cu ser aglutinant de tip.
  - Fenomenul de vibrioliză la cobai.

Se redactează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, biochimice, antigenice și de patogenitate ale tulpinii de vibrion izolată de la purtător.

Decelarea vibrionilor holerici în apa contaminată

— Se filtrează 5 litri de apă de cercetat printr-un filtru Seitz de 6 cm diametru. Se scoate cu precauţii de sterilitate membrana filtrantă, se secţionează în cîteva fragmente cu o foarfecă sterilă şi se însămînţează într-un flacon cu 30 ml apă peptonată alcalină. Se incubează la 37°.

— După 6—8 ore se efectuează subculturi:

↓ Pe mediile de îmbogăţire (apă peptonată).

↓ Pe mediile selective solide (Aronson).

— Se controlează mediile selective solide şi dacă nu au apărut colonii se fac alte subculturi din mediile de îmbogăţire pe cele selective.

— Identificarea tulpinii izolate în cultură pură se face după schema descrisă mai sus.

Se eliberează buletinul de analiză, în care se descriu caracterele morfologice, de cultură, biochimice, antigenice şi de patogenitate ale tulpinii de vibrion izolate din apă.

BIBLIOGRAFIE

BIRGER O. G. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase G. J. Sinai şi O. G. Birgher, Ed. ştiinţifică, Bucureşti, 1952, p. 362—371.

BURROWS W., POLLITZER R. — Laboratory diagnosis of cholera, *Bull. O.M.S.*, 1958, vol. 18, 275—290.

DUMAS J. — Bactériologie médicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 485—497.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 574—587.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 348—352.

KOLMER J., BOERNER F. — Approved Laboratory Techniques, ed. a 4-a, Ed. Appleton-Century, New-York, 1945, p. 476—478.

KOLMER J. A. — Clinical diagnosis by Laboratory Examinations, ed. I, Ed. Appleton-Century, New-York, p. 944—945.

LEVASHOV V. S. — Studiu comparativ al proprietăţilor biologice ale formelor G şi L filtrabile, regenerate, de *Vibrio Mecinikovi* şi *Proteus vulgaris*, *Z. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1957, nr. 8, p. 29—35.

MACKIE T. J., MC CARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 469—474.

NESTORESCU N. — Bacteriologie medicală (sub red. prof. N. Nestorescu şi colab.), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 498—509.

STITT E. R., CLOUGH P. W., BRANHAM S. E. — Practical Bacteriology, Hematology and Parasitology, ed. a 10-a, Ed. Blakiston, New-York, p. 141—145.

THOMPSON R. V. — Microbiology and Epidemiology, ed. 4-a, Ed. Saunders, Philadelphia, 1958, p. 358—359.

TOPLEY and WILSON'S — Principles of Bacteriology and Immunity, ed. a 4-a, Ed. Edward Arnold, 1955, vol. I, p. 604—616; vol. II p. 1616—1624.

WHITBY L., HYNES M. — Medical Bacteriology, ed. 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 212—217.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, partea a II-a, p. 621—629.

WILSON T. A. — Bacterial and Mycotic Infections of Man, editat de Dubos R., ed. a 2-a, Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 507—515.

ZINSSER H. — Textbook of Bacteriology, ed. a 11-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New-York, 1957.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INTOXICAŢIILE ALIMENTARE PRODUSE DE BACTERII

Toxiinfecţiile alimentare determinate de bacterii se caracterizează prin apariţia bolii la un grup de indivizi care au consumat în comun alimente contaminate şi se manifestă prin tulburări gastrointestinale cu evoluţie acută. Din punctul de vedere al mecanismului de acţiune a bacteriilor, se disting două forme de manifestare:

Forma infecţioasă, în care microbul, pătruns în organismul bolnavului o dată cu alimentele contaminate, se înmulţeşte şi elaborează produsele sale toxice dăunătoare. Această formă se caracterizează printr-o incubaţie de 8—24—48 de ore, cu evoluţie febrilă, cefalee, greţuri, vărsături, crampe şi dureri abdominale, însoţite de numeroase scaune diareice. Această formă este mai gravă şi poate da cazuri mortale, dacă survine la indivizi cu leziuni organice preexistente.

Forma toxică este determinată de ingerarea de către un bolnav a toxinei microbiene elaborată de bacteria patogenă în cantitate mare în alimentul contaminat care atunci cînd este păstrat la temperaturi peste 10—20° reprezintă un substrat nutritiv deosebit de favorabil înmulţirii masive a microbilor. În această formă, datorită resorbţiei rapide a toxinei din aliment la nivelul tubului digestiv, perioada de incubaţie este foarte scurtă (1—5 ore), iar simptomele principale constau în vărsături intense, diaree masivă, deshidratare puternică şi stare de prostraţie. Durata acestei forme de boală este scurtă, de obicei 24—48 de ore.

Datorită acestor două forme de manifestare, intoxicaţiile alimentare de natură microbiană au fost denumite toxiinfecții alimentare. Etiologia microbiană a toxiinfecțiilor alimentare este destul de variată și sînt incriminate următoarele specii bacteriene: coci patogeni enterotoxici (stafilococul și streptococul), bacterii sporulate, aerobe, ca *B. subtilis*, *B. anthracis* și *B. cereus*; bacterii sporulate anaerobe, ca *Cl. perfringens* și *Cl. botulinum*; enterobacterii patogene ca *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Proteus* etc.

TABELUL 122

Principalele caracteristici ale toxiinfecțiilor alimentare determinate de bacterii, după Dack „Food poisoning" (1949)

Boala	Agent etiologic	Intoxicație	Infecție	Simptome principale	Apariția simptomelor după ingestie
Intoxicație botulinică	*Clostridium botulinum* prin exotoxină	+	—	Disfagie, diplopie, afonie, dispnee cu sufocare și moarte prin paralizia mușchilor respiratori	De la 2 ore pînă la 8 zile, în medie 1—2 zile
Intoxicație stafilococică	Stafilococul patogen prin enterotoxină	+	—	Grețuri, vărsături, diaree, crampe abdominale, tenesme și stare de prostrație intensă	De la 1 la 6 ore, în medie 2—3 ore
Infecții cu salmonele	*S. enteritidis, S. aertrycke, S. cholerae-suis,* etc.	—	+	Dureri abdominale, diaree, frison și febră, vărsături frecvente, stare de prostrație	De la 8—24 de ore, în medie 12—18 ore
Infecții streptococice	*Str. viridans, Str. fecalis* (enterococ)	—	+	Grețuri, colici abdominale, diaree, uneori vărsături	De la 4—12 ore, în medie 4—5 ore

Izbucnirile de toxiinfecții alimentare au un pronunțat caracter sezonier. Anotimpurile în care temperatura mediului ambiant depășește 10° sînt favorabile înmulțirii bacteriilor care contaminează alimentele. În acest sens lunile de vară reprezintă anotimpul în care se înregistrează cea mai mare incidență a izbucnirilor de toxiinfecții alimentare. Majoritatea cazurilor de toxiinfecții alimentare se limitează la colectivități restrînse, au, de obicei, un caracter familial, cu evoluție benignă și nu atrag atenția organelor sanitare. Uneori însă, cînd se contaminează un aliment de larg consum — cum sînt laptele și derivatele de lapte, mezelurile etc. —, se asistă la apariția unui mare număr de cazuri de toxiinfecții alimentare.

Profilaxia toxiinfecțiilor alimentare se realizează prin conservarea igienică a alimentelor în ambalaje corespunzătoare și la temperatură scăzută. Păstrarea la temperatură sub +4° nu permite bacteriilor să se înmulțească, să contamineze masiv alimentul și să secrete cantități mari de toxină în aliment. Prepararea culinară a alimentelor și circuitul alimentelor, mai ales al celor perisabile, trebuie efectuate în condiții de curățenie riguroasă, cu respectarea regulilor de igiena alimentară.

Măsurile de profilaxie referitoare la personalul calificat din industria alimentară și rețeaua unităților de alimentație publică sînt tot atît de importante ca și cele care se adresează alimentului însuși. Educația sanitară a personalului care lucrează în acest sector, privind deprinderile de igienă individuală, trebuie efectuată cu rigurozitate, precum și depistările de laborator, pentru decelarea purtătorilor cronici de enterobacterii patogene și de stafilococ. Monografia publicată în 1959 de către Editura medicală: „Toxiinfecțiile alimentare" pune la îndemîna specialistului de laborator și epidemiologului, cu competență, pe baza unei bibliografii bogate, toate datele acestei probleme complexe.

Diagnosticul de laborator

În investigațiile pe care le efectuăm în vederea stabilirii etiologiei unei toxiinfecții alimentare trebuie să ținem seama, pe de o parte, de faptul că un număr variabil de specii microbiene pot fi incriminate ca agenți etiologici, iar pe de altă parte, din produsele patologice de la bolnav și din alimentele contaminate trebuie să izolăm aceeași specie bacteriană.

În țara noastră, în ordinea frecvenței și importanței epidemiologice a cazurilor de toxiinfecții alimentare, trebuie să avem în vedere următorele grupuri de bacterii patogene:

1. Grupul *Salmonella*, cu speciile *S. typhi murium*, *S. enteritidis* Gärtner, *S. cholerae suis*, *S. cholerae suis*, varietatea Kunzendorf, *S. paratyphi C.*, *S. heidelberg* etc.
2. Genul *Staphylococcus*, cu speciile *Staph. aureus* şi *Staph. albus*.
3. Genul *Shigella*, cu grupurile *Sh. flexneri* şi *Sh. sonnei*.
4. Genul *Streptococcus*, cu specia *Str. fecalis* (enterococ).
5. Genul *Clostridium* cu speciile *Cl. perfringens* şi *Cl. botulinum*.
6. Genul *Escherichia*, cu specia *E. coli*.
7. Genul *Proteus*, cu specia *Proteus vulgaris*.
8. Genul *Bacillus*, cu speciile *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. cereus*.

Apare deci necesar, ca în investigaţiile de izolare a agentului etiologic să folosim mediile de cultură care să ne permită cuprinderea tuturor acestor specii de bacterii patogene.

Alimentele cele mai susceptibile de a fi contaminate sînt: carnea şi produsele de carne, mai ales mezelurile; laptele şi derivatele de lapte; ouăle, în special cele de raţă, care se contaminează cu salmonele în cloaca pasării, înainte de formarea cojii oului.

Alimentele contaminate nu se deosebesc, în cele mai multe cazuri, din punct de vedere organoleptic, de cele normale.

Diagnosticul de laborator în toxiinfecţiile alimentare se bazează pe izolarea şi identificarea agentului etiologic din:

— alimentul incriminat;
— materiile fecale;
— lichidul de vărsătură;
— sînge (numai în formele infecţioase, care au perioadă de bacteriemie).

În cazurile mortale, din conţinutul intestinal, sînge, organe parenchimatoase etc.

Din fiecare produs patologic care se recoltează, ca şi din probele de alimente contaminate, se efectuează o suspensie în 5 ml de soluţie clorurosodică 8,5‰ sterilă, din care se efectuează însămînţări pentru decelarea enterobacteriilor patogene, a stafilococilor şi streptococilor enterotoxici şi a sporulaţilor aerobi şi anaerobi. În cazul că există indicaţii de ordin clinic-epidemiologic asupra probabilităţii unei toxiinfecţii botulinice, se va face, concomitent cu însămînţările, inocularea la şoareci a filtratelor din produsele patologice şi alimentele incriminate pentru decelarea prezenţei şi tipului de toxină botulinică.

În cazul că însămînţările şi inoculările nu se pot efectua în primele ore, produsele recoltate se vor păstra la temperaturi scăzute sub +4° cel mult 8—12 ore. Dacă recoltele trebuie transportate la distanţe care depăşesc timpul de 24 de ore, este necesar să folosim, fie lichide conservante — cum sînt cele cu adaos de glicerină pentru enterobacteriile patogene —, fie preferabil însămînţarea directă în medii de îmbogăţire lichide, cu tetrationat, cu selenit de Na sau acid boric pentru enterobacterii şi hiperclorurat lichid pentru stafilococ şi enterococ.

A. *Enterobacteriile patogene*

Sînt reprezentate în ordinea frecvenţei de *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* şi *Proteus*. Pentru izolarea lor mediul lactozat cu bilă după Istrate şi Meitert este cel mai indicat. Aceleaşi servicii le face şi mediul *Shigella-Salmonella*, mai puţin utilizat la noi.

Pe mediul selectiv Istrate-Meitert, însămînţat prin tehnica epuizării ansei, pentru a obţine colonii izolate, enterobacteriile se dezvoltă caracteristic. *Escherichia* fermentează lactoza şi dezvoltă colonii galbene, *Proteus* colonii, cu centrul verde închis şi periferia decolorată, iar *Shigella-Salmonela*, colonii mici translucide lactozonegative, care nu modifică mediul. Coloniile izolate controlate macroscopic şi microscopic prin frotiu colorat Gram se subcultivă pe geloză înclinată şi se efectuează testele de identificare pe baza structurii antigenice în caz de *Shigella* şi *Salmonela* şi a criteriilor biochimice în caz de *Escherichia* şi *Proteus*.

B. *Stafilococii şi streptococii enterotoxici*

Coloniile galbene, manito-pozitive pe mediul Chapman, sînt caracteristice stafilococilor patogeni, dar în cazul izolării stafilococilor enterotoxici ne interesează şi coloniile manitonegative, deoarece elaborarea de enterotoxină se întîlneşte şi la tulpini cu patogenitate redusă sau lipsite de patogenitate pentru om.

Din aceste considerente unii autori preferă mediul cu geloză-sînge hiperclorurat după Gamova-Kaiukova care are avantajul de a favoriza şi creşterea enterococilor.

Coloniile izolate se controlează prin frotiu colorat Gram şi diferenţa de formă şi aşezare a celor 2 coci gram-pozitivi, stafilococul, coci rotunzi izolaţi şi în grămezi, enterococul, coci ovalari, izolaţi în diplo sau în lanţuri scurte, reprezintă un prim indiciu. Din coloniile izolate se efectuează subculturi pe geloză înclinată și pe geloză-sînge, pentru obținerea tulpinii în cultură pură.

Tulpina în cultură pură se identifică în cazul stafilococului prin testele de patogenitate *in vitro* și prin cultivare în geloză moale în atmosferă cu 20% CO_2, pentru elaborarea enterotoxinei și evidențierea ei prin testul Dolman.

TABELUL 123

Efectul procedeelor de conservare a alimentelor asupra bacteriilor patogene (după Shewan, 1959)

Procedeul de conservare	*Salmonella Shigella*	*Cl. Bolulinum*			Stafilococii	
	Forma vegetativă	Forma vegetativă	Spor	Toxină	Forma vegetativă	Toxina
Refrigerare pînă la 0°	Creșterea are loc pînă la 10°. Încetează complet sub 4°	Creștere lentă la 10° (în 27—98 de zile)	Ecloziunea sporului la 15° în interval de 13—22 de zile. Între 5 și 10° sporul nu se dezvoltă	Nu influențează toxina	Creșterea și formarea toxinei nu are loc sub 4°. Creștere și elaborare de toxină în 3 zile la 18° și în 12 ore la 37°	Nu este influențată timp de 2 luni la — 4°
Înghețare sub 0°	Pot supraviețui 14 luni la —18°	Poate supraviețui la —20°	Rezistă 14 luni la —16°	Nu este distrusă după 14 luni la — 16° și după 2 luni la — 79°	Supraviețuiesc 14 luni la —18°	Nu există date
Uscare sau deshidratare	Creșterea încetează cînd conținutul de H_2O scade sub 30%	Nu există date	Supraviețuiește probabil	Nu este distrsusă 6 luni după uscare	Creșterea încetează cînd conținutul de H_2O scade sub 20 — 30 %	Nu există date
Afumare : a) la rece b) la cald	Probabil rezistă Nu rezistă	Nu există date Probabil distrusă	Probabil rezistă Probabil rezistă	Poate fi parțial detoxifiată	Distruși după 2 $^1/_2$ Nu rezistă	Nu există date
Sărare	Creșterea inhibată la concentrații de NaCl, care depășesc 6,5%. Pot supraviețui 22 de zile în peștele sărat	Supraviețuiește în concentrații de 10 — 12 % ClNa. Creștere în soluții cu 8 % Cl Na	Rezistă timp îndelungat	Nu există date	Poate supraviețui și crește în concentrații ridicate de ClNa	Poate fi elaborată în peștele sărat
Autoclavare	Distruse	Distrusă	Distrus	Distrusă în 30 de minute la 80°	Distruși	Relativ termorezistentă. Prin fierbere 60 minute sau autoclavare timp de 20 de minute la 120° se degradează parțial

Pentru enterococ se poate face identificarea prin evidențierea serologică a carbohidratului de grup D Lancefield și diferențierea cu ceilalți streptococi prin următoarele teste : termorezistența 30 de minute la 60°, creșterea pe medii cu telurit de K în concentrație de 1/2 500, absența hemolizei, dezvoltare la pH=9,6, în prezența concentrațiilor mari de bilă, 40% și a concentrațiilor de 6,5% ClNa.

Există posibilitatea de diferențiere și în interiorul grupului D la enterococi, care conține 4 specii cu 2 varietăți : *Str. fecalis* var. *zymogenes*, *Str. fecalis* var. *liquefaciens*, *Str. faecium*, *Str. durans*, *Str. bovis*.

Deoarece toate aceste specii și variante pot fi întîlnite în alimente, redăm mai jos, adaptat după Shattock 1953, principalele teste de diferențiere a enterococilor în cadrul grupului D.

Lizotipia cu bacteriofagi stafilococici și streptococici poate fi cerută în vederea investigațiilor epidemiologice.

TABELUL 124

Teste de diferențiere a streptococilor grupului D

Teste	*Str. fecalis*	*Str. fecalis var. zymogenes*	*Str. fecalis var. liquefaciens*	*Str. fecium.*	*Str. durans*	*Str. bovis*
Hemoliză β	—	+	—	—	±	—
Creștere la 10 %	+	+	+	+	—	—
Creștere la pH 9,6	+	+	+	+	±	—
Creștere bilă 40 %	+	+	+	+	+	+
Rezistența 30′ la 60°	+	+	+	+	+	—
Reducerea laptelui turnesolat	+	±	+	—	—	—
Lichefierea gelatinei	—	±	+	—	—	—
Creșterea telurit K 1/2 500	+	+	+	—	—	—
Fermentarea						
manită	+	+	+	±	—	±
sorbitol	+	+	+	±	—	—
sucroză	+	+	+	±	—	+
rafinoză	—	—	—	±	—	+
arabinoză	—	—	—	+	—	±
Elaborare de tiroxindecarboxilază	+	+	+	±	±	—

C. *Bacteriile sporulate aerobe și anaerobe*

Suspensiile bacteriene se încălzesc, timp de 30 de minute la 65° pentru distrugerea florei vegetative de asociație, apoi se însămînțează pe medii uzuale de cultură, bulion simplu și prin epuizarea ansei pe plăci cu bulion agar 2 %, care se incubează la 37° în atmosferă obișnuită. Coloniile izolate pe agar sînt controlate prin frotiu pentru prezența bacililor gram-pozitivi sporulați și se efectuează subculturi pe geloză înclinată. Diferențierea *B. anthracis* de sporulații aerobi nepatogeni se face prin inocularea a 0,1—0,5 ml subcultură în bulion la șoarece, care face o infecție septicemică cu bacilii antraxului. *B. anthracis* se mai diferențiază și prin absența mobilității și prezența capsulei.

Pentru izolarea sporulaților anaerobi, *Cl. perfringens* și *Cl. botulinum* se însămînțează aceeași suspensie încălzită timp de 30 minute la 65° în bulion glucozat anaerob sau în bulion cu ou sau în mediul Kondratieva și în 2 tuburi geloză glucozată Veillon. Deoarece *Cl. botulinum* are un metabolism lent și se dezvoltă cu greutate cînd dorim să-l izolăm, este util să asociem mediul de îmbogățire după Weinberg.

Mediile incubate anaerob sînt controlate pentru prezența creșterii. Din mediile lichide se fac subculturi prin metoda diluțiilor succesive în geloză moale în tuburi înguste Weinberg pentru obținerea coloniilor izolate. În coloana de geloză coloniile de *Cl. welchii* apar de formă lenticulară, biconvexă. Identificarea tulpinii de *Cl. welchii* se face pe baza caracterelor biochimice; înnegrirea mediului Kondratieva, producerea de indol și coagularea laptelui cu producere de cheag alveolar. *Cl. perfringens* este singurul anaerob patogen sporulat lipsit de mobilitate. În cazul prezenței *Cl. perfringens* în produsele patologice și alimentele dintr-o toxiinfecție alimentară se pune problema identificării tipului de toxină. *Cl. perfringens* elaborează 6 tipuri de toxină etichetate de la A la F, însă din punct de vedere practic ne interesează toxina A, care dă formele benigne de intoxicație și toxina F, care determină formele clinice grave de enterită necrotică. În ultimii ani toxiinfecțiile cu tipul *A* de toxină a *Cl. perfringens* sînt considerate cu frecvență apropiată de cele date de salmonele și stafilococ.

Pentru obținerea toxinei, tulpina este însămînțată în bulion VF. Cultura se centrifughează timp de 10 minute la 3 000 turații/min., iar supernatantul reprezintă toxina de cercetat. Este preferabil să folosim procedeul de separare a toxinei prin centrifugare, deoarece filtrarea prin Seitz reține o parte din moleculele de toxină. Identificarea se face cu ajutorul serurilor monovalente antitoxice A, B, C, D, E și F. Se amestecă în tuburi de hemoliză sterile 0,4 ml toxină de cercetat cu 0,1 ml ser monovalent. Amestecurile se mențin în contact 1 oră la 37° apoi sînt inoculate intraperitoneal la 6 șoareci. Șoarecele care rămîne în viață după 24 de ore ne indică tipul toxinei, deoarece a fost neutralizată de serul antitoxic corespunzător.

Tulpinile de *Cl. botulinum* elaborează 5 tipuri de toxine, A, B, C, D și E. Dintre acestea în intoxicațiile botulinice ce pot surveni în țara noastră ne interesează numai tipurile A și B de toxină, excepțional tipul E, cînd sînt incriminate conservele de pește.

În practică diagnosticul de laborator al unei toxiinfecții botulinice se bazează pe decelarea directă în produsele patologice, materii fecale, vomismente, urină și alimente contaminate a prezenței toxinei botulinice și eventual pe încercările de cultivare a bacililor botulinici.

Porțiuni din fiecare produs patologic și fragmente din alimentele contaminate se triturează într-un mojar, steril, apoi se suspendă 10—15 ml ser fiziologic steril. Suspensia se centrifughează timp de 20 de minute la 3 000 turații/min., supernatantul se folosește pentru inoculările la animal și sedimentul se poate folosi după resuspendare în serul fiziologic și încălzire timp de 30 de minute la 70° la însămînțările anaerobe necesare izolării *Cl. botulinum*.

Identificarea toxinei botulinice se efectuează prin testul neutralizării toxinei prin antitoxina botulinică corespunzătoare. Animalele cele mai sensibile față de acțiunea toxinei botulinice sînt cobaiul și șoarecele.

În 3 tuburi de aglutinare sterile se amestecă cîte 1 ml din toxina de cercetat cu 1 ml din antitoxina botulinică specifică de tip în modul următor :

— tubul notat A conține 1 ml de toxină de cercetat + 1 ml antitoxină botulinică tip A;

— tubul notat B conține 1 ml toxină de cercetat + 1 ml antitoxină botulinică tip B;

— tubul notat E conține 1 ml toxină de cercetat + 1 ml antitoxină botulinică tip E.

Se amestecă prin aspirație cu cîte o pipetă Pasteur sterilă pentru fiecare tub și se lasă la termostatul de 37°, timp de o oră.

Din fiecare tub se inoculează cîte 1 ml amestec toxină-antitoxină la 2 șoareci pe cale subcutanată. Șoarecii inoculați sînt așezați în 3 borcane etichetate A, B și E. Cei 2 șoareci care supraviețuiesc ne indică identitatea toxinei, datorită neutralizării efectului ei prin antitoxina specifică corespunzătoare. Ceilalți 4 șoareci mor în interval de 12—24 de ore prin intoxicație botulinică.

DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC CU PRODUSELE PATOLOGICE PROVENITE DINTR-O TOXIINFECȚIE ALIMENTARĂ

Schema de diagnostic

Produse : materii fecale, vomismente, alimente contaminate, produse de autopsie

Din fiecare produs patologic recoltat se efectuează o suspensie în 5 ml ser, fiziologic 8,5 ‰, steril. Din suspensia bacteriană se însămînțează astfel :

A. Pentru grupul enterobacteriilor patogene :

- Prin epuizarea ansei pe 2 plăci cu mediul Istrate-Meitert sau *Shigella-Salmonella*.
- Cu pipeta Pasteur, cîte 6 picături, în 2 tuburi cu mediul de îmbogățire *Müller-Kauffmann*.

B. Pentru stafilococii și streptococii enterotoxici :

- Prin epuizarea ansei pe 2 plăci cu mediul Chappmann solid.
- Prin epuizarea ansei pe 2 plăci cu agar-sînge hiperclorurat Gamova-Kaiukova.

C. Pentru sporulați aerobi și anaerobi :

- Suspensia bacteriană de cercetat se încălzește timp de 30 de minute la 70° pentru distrugerea formelor vegetative ale florei de asociație.
- Însămînțările se fac în 2 tuburi cu bulion simplu și 2 tuburi cu geloză înclinată care se incubează în atmosferă obișnuită pentru decelarea sporulaților aerobi, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*. Însămînțări se mai efectuează și în 2 tuburi cu bulion glucozat anaerob sau bulion-ou și în 2 tuburi cu geloză glucozată Veillon. Cînd se bănuiește o toxiinfecție botulinică se folosește și un mediu de îmbogățire Weinberg pentru *Cl. botulinum*.

D. În cazul că se bănuiește o *toxiinfecție botulinică*, se va inocula supernatantul suspensiei de cercetat după centrifugarea timp de 20 de minute la 3 000 turații/min., la șoarece pentru evidențierea tipului de toxină.

- Pentru grupul enterobacteriilor patogene se controlează cu lupa coloniile care apar pe plăcile cu mediul Istrate-Meitert. Toate tipurile de colonii ce se dezvoltă pe placă vor fi controlate prin frotiu colorat Gram și trecute în subcultură pe geloza înclinată pentru obținerea culturii pure.

  Identificările se vor efectua pe baza criteriilor morfologice, de cultură, biochimice și de structură caracteristice enterobacteriilor patogene.
- Pentru grupul stafilococilor și streptococilor enterotoxici se vor controla macroscopic cu lupa plăcile cu mediul Chapman pentru apariția coloniilor manitopozitive care se vor controla prin frotiu colorat Gram pentru prezența stafilococului și se vor subcultiva pe geloză înclinată pentru obținerea culturii pure. Identificarea se va efectua cu ajutorul testelor de patogenitate *in vitro* pentru stafilococ și evidențierea producerii de enterotoxină prin testul Dolman.

  Pe mediul cu agar-sînge hiperclorurat Gamova-Kaiukova se vor urmări în special apariția coloniilor de enterococ pe care le deosebim de stafilococ după absența hemolizei și frotiul colorat Gram care ne indică prezența cocilor ovalari izolați sau în lanţuri scurte. Din coloniile izolate se fac subculturi pentru obţinerea culturii pure necesare identificărilor cu ajutorul testelor biochimice caracteristice streptococilor din grupul D.

— Pentru grupul sporulaţilor se controlează culturile incubate aerob pentru apariţia coloniilor, se efectuează frotiuri colorate Gram pentru evidenţierea bacililor Gram-pozitiv şi se efectuează subculturi pe geloză înclinată în vederea testelor de identificare caracteristice microbilor din genul *Bacillus*.

Mediile incubate anaerob sînt, de asemenea, controlate macroscopic şi prin efectuarea de subculturi din mediile anaerobe lichide prin tehnica diluţiilor succesive în geloză moale în tuburi Weinberg, spre a obţine colonii izolate şi ulterior cultură pură. Diagnosticul se continuă prin testele de identificare a toxinelor.

— Se continuă testele de identificare a tulpinii sau tulpinilor izolate pe baza caracteristicilor de gen şi specie. Este important de menţionat faptul că în vederea diagnosticului etiologic, tulpina izolată trebuie să fie aceeaşi în produsul sau produsele patologice de la bolnavi şi în alimentul contaminat şi să concorde cu indicaţiile diagnosticului clinic şi epidemiologic al toxiinfecţiei alimentare.

— Se eliberează buletinul de analiză, în care se arată caracterele morfologice, de cultură, biochimice, antigenice, eventual de toxinogeneză şi patogenitate la animal ale tulpinii sau tulpinilor izolate. Se va face corelaţia necesară între produsele patologice şi alimentele din care s-a izolat tulpina cu diagnosticul formei clinice de toxiinfecţie alimentară şi cu investigaţiile de ordin epidemiologic.

BIBLIOGRAFIE

ALLISON V. D., HOLBS B. C., MARTINI P. H. — A widespread outbreak of staphylococcus food-poisoning *Monthly Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv.*, 1949, vol. 8 p. 38—47.

ALLISON V. D. — Discussion on food-poisoning, *Proc. Royal Soc. Med.*, 1949, nr. 42, p. 214—220.

BELIKOV L. A. — Toxiinfecţie prin lapte, cauzată de bacili enterici, *J.M.E.I.*, 1957, nr. 3, p. 46—47.

COOK J., ELLIOTT C., ELLIOTT-SMITH A., FRISBY B. R., GARDNER A.M.N. — Staphylococcal diarrhoea with an account of two outbreaks in the same-hospital, *Brit. Med. J.*, 1957, nr. 9, p. 542—547.

DEWBERRY B. E. — Food poisoning, ed. a 4-a, Ed. Leonard Hill, Londra, 1959.

DUMAS J. — Bactériologie médicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 420—423.

DRĂGER G. — Entstehung und Verhütung von Lebensmittelvergiftungen durch Salmonella Bakterien, Ed. G. Fischer, Jena, 1958.

GASTINEL P. — Précis de Bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 287 (stafilococ), 348—350 (enterococ), 450, 454—458 (*Salmonella*), 819—828 (*Cl. botulinum*).

HENŢIU VALERIA, DIOŞI P. — Izbucnire de toxiinfecţii alimentare produse de *Escherichia coli*, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1961, nr. 4, p. 341—346.

IENIŞTEA C. — Microbiologia alimentelor, Editura medicală, Bucureşti, 1958.

IENIŞTEA C., IEREMIA T. — Studiu microbiologic al alterării peştelui de apă dulce păstrat la temperatura camerei, *Igiena* (*Bucureşti*), 1958, nr. 2, p. 121—126.

IENIŞTEA C., IEREMIA T. — Studiu microbiologic al alterării peştelui de apă dulce păstrat la temperatura camerei. Considerente asupra bacteriilor izolate, *Igiena* (*Bucureşti*), 1959, nr. 2, p. 145—150.

IGNATOVICI Z. A. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase G. I. Sinai şi O. G. Birgher, Ed. ştiinţifică, Bucureşti, 1952, p. 303—319.

KOLMER J. A. — Clinical diagnosis by laboratory examinations, ed. I, Ed. Appleton-Century, New-York, 1941, p. 392; 941—942.

MACKIE T. J., McCARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 4-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 445—449.

MELNIK E. G., MIHAILOVA YU. M. — Cercetări comparative clinice şi de laborator în toxiinfecţiile alimentare cauzate de *Salmonella*, *J.M.E.I.*, 1961, nr. 10, p. 122—126.

NESTORESCU N., POPOVICI MARCELA — Toxiinfecţiile alimentare, Ed. medicală, Bucureşti, 1959.

NESTORESCU N. şi colab. — Bacteriologie medicală Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 339—340, 342—348.

NICOLESCU MARCELA — Stafilococul ca agent patogen al toxiinfecţiilor alimentare, *Microbiologia* (*Bucureşti*) 1960, nr. 4, p. 313—322.

O.M.S. — Série de rapports techniques, nr. 184. Conférence-technique européenne sur les infections et les intoxications alimentaires, O.M.S., Genève, 1959.

SĂSĂRMAN A., HORODNICEANU THEA, BERLOGEA J., CIOCÎRLIE J., STRAŢI J., SCHONFELD S., DOSPINA MARIA — Izolarea *Cl. perfringens* tip A dintr-un aliment care a provocat o toxiinfecţie alimentară. *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1961, nr. 6, p. 527—530.

STAMATIN N. — Microbiologie veterinară, Ed. Agrosilvică, Bucureşti, 1958, vol. II, p. 56—98.

STITT E. R., CLOUGH P. W., BRANHAM S. E. — Practical bacteriology, hematology and parasitology, ed. a 10-a, Ed. Blakiston, New-York, 1948, p. 131—133.

THATCHER F. S., SIMON W. — A comparative appraisal of the properties of staphylococci isolated from clinical sites and from dairy products, *Canadian J. Microbiol.*, 1956, vol. 2, nr. 7, p. 703—714.

THOMPSON R. V. — Microbiology and epidemiology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Londra, 1958, p. 348—351.

TORGOVITSKAIA M. S. — Un caz de toxiinfecţie alimentară, *J.M.E.I.*, 1957, nr. 8, p. 129.

TOPLEY and WILSON'S — Principles of bacteriology and immunity, ed. a 4-a, Ed. Edward Arnold, Londra, 1955, vol II, p. 1794—1816.

WHITBY J., HYNES M. — Medical bacteriology, ed. a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 203—206.

ZAEWA C. P. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, G. I. Sinai şi O. G. Birger, Ed. ştiinţifică, Bucureşti, 1952, p. 319—329.

ZINSSER H. — Textbook of bacteriology, ed. a 11-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New-York, 1957, p. 248, 393—394, 502—503.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU SPIROCHETE

Ordinul: *Spirochaetales.* Familia: *Treponemataceae.* Genurile: *Borellia, Treponema* şi *Leptospira*

Generalităţi

Microorganisme mobile, cu corpul în formă de spirală. Celula bacteriană are mişcări caracteristice, de rotaţie în jurul axei, de flexie, de reptaţie şi de pendulare. Se colorează greu prin metodele obişnuite şi necesită metode speciale. Unele din ele cultivă cu greutate pe medii complexe, cu bază de ser, ascită, extract globular, extract de ficat cu fragmente de ţesuturi. Se întîlnesc foarte răspîndite în natură atît specii patogene pentru om şi animale, cît şi specii saprofite. Printre infecţiile pe care le determină la om, cele mai importante sînt sifilisul, febra recurentă şi leptospirozele.

Transmiterea se face: pe cale directă la *Treponema*, prin insecte vectoare la *Borellia* şi prin contaminare cu ape poluate sau cu dejecţiile animalului purtător la *Leptospira.*

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL SIFILISULUI

Familia: *Treponemataceae.* Genul: *Treponema.* Specia tip: *Treponema pallidum*

Treponemele (trepo = răsucit; nemo = fir) sînt microorganisme parazite frecvent întîlnite la om şi animale. Există numeroase specii parazite comensale şi cîteva specii patogene pentru om. Morfologia treponemelor nepatogene este foarte asemănătoare cu aceea a celor patogene şi uneori diagnosticul diferenţial, folosind criterii morfologice, este greu de realizat.

Din punctul de vedere al patogenităţii pentru om treponemele pot fi clasificate în 2 categorii: treponeme patogene (*Treponema pallidum, Treponema pertenue, Treponema carateum*) şi treponeme nepatogene care parazitează sub forma de comensalism organismul uman (*Treponema genitalis, Treponema mucosum, Treponema calligirum, Treponema macrodentium, Treponema microdentium* etc.).

Dintre treponematozele umane cea mai cunoscută este luesul, care are o răspîndire largă pe suprafaţa globului. Pinta este o treponematoză limitată ca răspîndire la zona tropicală dintre cele două Americi, al cărei agent etiologic este *Treponema carateum*, descoperită de Saenz în 1938. Pianul sau framboesia este o treponematoză tropicală al cărei agent cauzal este *Treponema pertenue*, descoperită în anul 1905, de către Castellani.

Aceste treponematoze umane, datorită transmisiunii treponemelor pe cale genitală, sînt în acelaşi timp şi boli veneriene. În afara treponematozelor veneriene, există şi alte treponematoze umane de mai mică importanţă ca ,,Bejel'', o boală neveneriană răspîndită în Arabia, Algeria etc.

Dintre treponematozele animale este important să cunoaştem treponematoza iepurilor cu *Treponema cuniculi*, deoarece poate fi uşor confundată cu *Treponema pallidum*, în încercările de a realiza sifilis experimental pe iepure.

Treponema pallidum sau *Spirocheta pallida*, descoperită de Schaudin în 1905, provoacă la om sifilisul sau luesul. Omul se infectează prin contaminare directă sau pe cale congenitală. Infecţia directă este urmată de apariţia şancrului sau sifilomului. Această etapă de evoluţie a bolii, denumită perioadă primară, durează 2—4 săptămîni, cu prinderea ganglionilor locoregionali, este urmată apoi de generalizarea microbului pe cale sanguină (perioada secundară) şi de localizarea în ţesuturi (perioada terţiară) a sifilisului visceral şi a neurosifilisului.

Morfologie şi caractere de coloraţie

Treponema pallidum are o lungime mijlocie de 6—14 μ; corpul este format din 10—12 spirale foarte regulate. Se colorează greu şi numai cu metode speciale.

Caractere de cultură

Microbul a putut fi cultivat cu greutate şi nu mai mult de 48 de ore, pe medii foarte complexe.

Tulpinile de treponeme din cultură izolate de Noguchi, Zinsser, Reiter şi Kazan au fost iniţial obţinute din leziuni sifilitice, dar astăzi sînt considerate ca treponeme parazite comensale, care au contaminat leziunile. Treponemele se dezvoltă în anaerobioză şi necesită pentru creştere medii sintetice foarte complexe. Tulpina Reiter a putut fi cultivată în serie pe un mediu sintetic cu 13 aminoacizi.

Rezistenţa şi sensibilitatea la antibiotice şi chimioterapice

Microorganisme delicate, sînt rapid distruse în mediul extern sau în contact cu oxigenul molecular şi antisepticele uzuale. În testiculele iepurilor infectaţi experimental, treponema sifilisului rezistă 5 ore la 39° şi 2 ore la 41°,5. Aceste observaţii au fost folosite la aplicarea tratamentului antiluetic prin malarioterapie şi curenţi de înaltă frecvenţă.

Datorită faptului că treponemele rezistă 2—3 zile în sîngele păstrat în frigider, este posibilă transmiterea sifilisului şi prin transfuzia cu sînge conservat, nu numai prin sînge proaspăt.

Congelate la —80° în ţesut testicular, treponemele îşi păstrează viabilitatea, de la cîteva luni pînă la 1 an. În felul acesta se pot păstra tulpinile izolate şi tulpina Nichols pentru testul Nelson. Bismutul, mercurul, arsenicul tri- şi pentavalent, penicilina, eritromicina, carbomicina, novobiocina, clortetracilina şi oxitetracilina omoară treponemele la iepurii infectaţi experimental. Medicamentul de elecţie pentru tratamentul sifilisului uman este penicilina, care pînă în prezent se bucură şi de avantajul de a nu fi determinat apariţia tulpinilor rezistente.

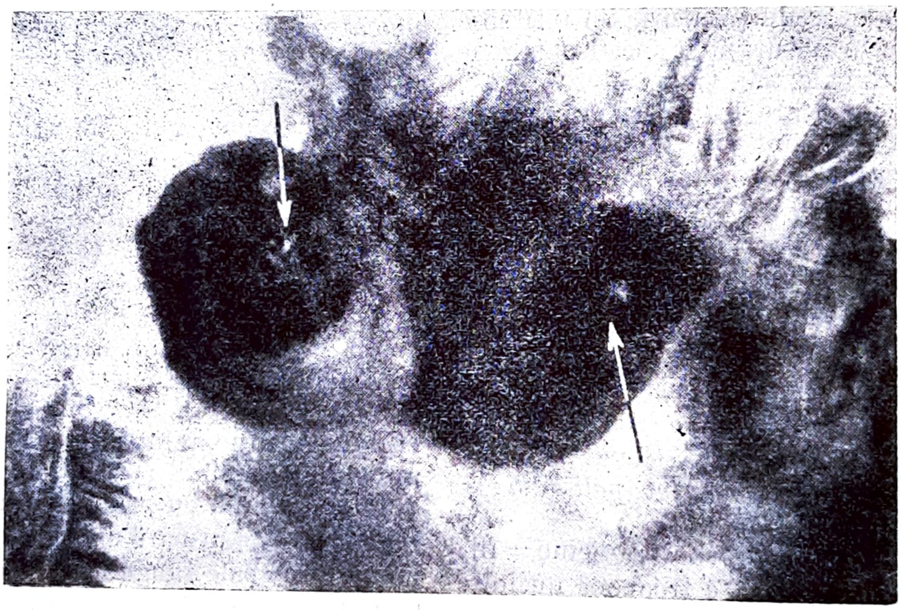


Fig. 341. — Sifilom experimental la iepure în a 40-a zi de evoluţie. realizat prin inoculare intrascrotală a serozităţii dintr-un şancru uman (după Gastinel).

Boala experimentală

Transmiterea se face cu greu; speciile susceptibile sînt: maimuţele superioare, iepurele şi şoarecele. Inocularea la iepure este urmată de apariţia unui şancru cu adenopatie regională şi de o fază septicemică consecutivă, iar cea corneeană produce cheratită transmisibilă în serie. Inocularea intratesticulară produce o orhită transmisibilă, care reprezintă şi un mijloc de întreţinere a tulpinilor în laborator. Şoarecele alb face infecţie inaparentă, cu generalizare pe cale sanguină şi localizare în toate organele, dar mai ales în piele şi sistemul nervos.

Starea de rezistenţă specifică în sifilis este o imunitate de infecţie sau premuniţie, asemănătoare cu aceea din infecţia tuberculoasă. Atîta timp cît în organismul infectat persistă treponemele, el rămîne refractar la orice reinfecţie. Dacă organismul a fost sterilizat prin tratament intens şi precoce, apare posibilitatea reinfecţiei cu sifilis.

Diagnosticul de laborator

A. **Examenul direct.** Se poate examina exsudatul din şancru, rozeolă şi plăci mucoase; în acestea se pun în evidență direct treponemele în produsul patologic.

La examenul pe fond întunecat al preparatului proaspăt din serozitatea șancrului treponemele apar refringente, cu mișcări active caracteristice. Șancrul este o leziune dură, rotundă, cu marginile tăiate drept și depozit pe fund. Recoltarea se face îndepărtînd acest depozit de pe fundul șancrului cu soluție clorurosodică 8,5‰ sterilă, după care se recoltează serozitatea, fără să producem sîngerare. Cînd șancrul a fost tratat cu antiseptice brutale, se execută o biopsie din leziune.

Pentru examenul în frotiu după metoda Burri, se amestecă o picătură de exsudat cu o picătură de tuș de China și se întinde pe lamă. Examinate cu obiectivul de imersie, treponemele apar incolore pe fond negru.

Examenul frotiului din serozitatea șancrului sau din rozeolă se poate face și prin colorare prelungită cu metoda Giemsa :

a) frotiul este fixat cu amestec de alcool-eter în părți egale ;

b) se colorează la cald 40—60 de minute cu soluție diluată Giemsa, 2 picături colorant la 1 ml apă distilată. Se menține baia de colorant la o temperatură de +60°.

Treponemele se colorează slab și palid cu o nuanță roșie-roză ; de aici și denumirea de *pallidum.* Cînd există spirili de asociere, aceștia sînt colorați intens și cu o nuanță violetă-albastră.

Examenul direct se mai poate efectua și pe frotiu impregnat cu nitrat de argint, după metoda Fontana-Tribondeau :

a) deshemoglobinizare cu soluție Ruge (acid acetic, 1 ml ; formol, 2 ml ; apă, 100 ml) ;

b) fixare cu alcool 96°, 5 minute ;

c) mordansare la cald cu tanin 5 %, 5 minute ;

d) spălare cu apă distilată ;

e) impregnare la cald cu nitrat de argint amoniacal, 1 minut ;

f) spălare cu apă distilată.

Treponemele apar în cîmpul microscopic, de culoare neagră-brună, cu spirele caracteristice impregnate cu sarea de argint

Secțiunile la parafină din organe sifilitice (creier, plămîn, ficat etc.) se pot colora cu metoda impregnării argentice, după Levaditi-Manuelian. Treponemele apar colorate negru-brun, pe fondul galben-brun al secțiunii de organ.

B. **Examenul indirect** se realizează prin reacții în serul sanguin și în lichidul cefalorahidian. În ultimul timp s-au introdus reacții mai specifice de mare valoare, ca : testul de imobilizare a treponemelor (T.I.T.) Nelson-Mayer, reacția de aglutinare și reacția de imunoaderență a treponemelor.

a) *Reacția de fixare a complementului* se aplică la diagnosticul serologic după tehnica Bordet-Wassermann. La început această reacție era socotită ca o reacție specifică antigen-anticorp, folosindu-se ca antigen un extract lipoidic din ficatul de făt sifilitic și ca anticorp, serul bolnavilor de sifilis. Ulterior s-a constatat că serul sifilitic reacționează și cu alte antigene lipoidice nespecifice în stare coloidală. Astăzi se folosește ca antigen clasic lipoidic în reacția Bordet-Wassermann un extract alcoolat din inimă normală de bou, denumit antigen Bordet-Ruelens.

În această situație, reacția nu a mai fost considerată ca o reacție de imunitate specifică, ci ca un fenomen nespecific, datorit acțiunii suspensiilor coloidale lipoidice asupra albuminelor serice. Noțiunea de anticorp specific sau sensibilizatrice, folosită la început, a trebuit să fie înlocuită cu aceea de reagină, care, din punct de vedere chimic este o globulină.

Astăzi se admite că infecția treponemică, ca și alte infecții de altfel, provoacă la nivelul țesuturilor lezate o restructurare biochimică importantă care se traduce prin apariția unor complexe cu structură străină organismului care acționează antigenic. Probabil că în structura acestor complexe lipoidice intră și fracțiuni proteice treponemice care le conferă astfel un grad de specificitate și obligă țesuturile să elaboreze autoanticorpi antilipidici. Suportul acestor anticorpi este constituit de globuline cu moleculă mare denumite reagine. Deci, reaginele sînt autoanticorpi elaborați de organism, ca răspuns la stimulul antigenic al complexelor lipoidice modificate din țesuturile lezate de infecția treponemică.

Reacția Bordet-Wassermann clasică, cu antigene lipoidice nespecifice, nu este decît o reacție caracteristică pentru sifilis, putînd fi pozitivă și în afecțiuni variate, în afara sifilisului, ca malarie, lepră, febră recurentă, tifos exantematic diabet etc., în care, la nivelul țesuturilor lezate, apare stimulul antigenic lipidic generator de autoanticorpi.

Cercetările în vederea ameliorării diagnosticului serologic al sifilisului au continuat tot timpul, aducîndu-se îmbunătățiri mai ales sub aspectul folosirii antigenelor. O serie de autori au ameliorat antigenele nespecifice, înlocuind pe cele vechi cu altele mai sensibile, ca de exemplu antigenul lipoidic Kolmer întărit cu lipide insolubile în acetonă, antigenul etero-alcoolic Demanche, antigenul cu cardiolipină Pangborn.

Alți autori au căutat să obțină antigene specifice preparate din culturi de treponeme, așa-numitele antigene treponemice.

Gaehtgens a reușit să prepare primul antigen treponemic din tulpina nepatogenă Reiter, pe care l-a denumit „Palligen''. D'Allessandro și Puccinelli au reușit să extragă tot din tulpina Reiter anumite fracțiuni antigenice și au denumit acest antigen treponemic „Pallignost''.

Aceste antigene treponemice s-au dovedit a fi superioare, ca sensibilitate, antigenelor lipoidice clasice și cardiolipinei, dar aproape la fel de nespecifice. Portnoy și Magnuson au reușit să prepare, din tulpina patogenă Nichols, primul antigen treponemic specific și cu sensibilitate egală celorlalte antigene treponemice. Datorită dificultăților de preparare a antigenelor treponemice și a antigenului Nichols în special, aceste antigene n-au intrat încă în practica serologiei de rutină. Laboratoarele care practică serologia de rutină se găsesc încă în faza înlocuirii antigenelor lipoidice clasice cu antigenul cardiolipinic, atît în reacția de fixare a complementului, cît și în unele reacții de floculare.

Cercetările din ultimii ani încearcă să situeze serologia sifilisului pe un nou făgaș, prin folosirea metodei imunofluorescenței ca metodă de diagnostic, cu ajutorul antigenelor treponemice din tulpinile Reiter și Nichols marcate cu izotiocianat de fluoresceină.

Reacția Bordet-Wassermann se bazează pe principiul fixării alexinei de către complexul antigen-reagină. Evidențierea reacției se face prin adăugarea unui al doilea sistem antigen-anticorp, denumit sistem hemolitic, care are rol de indicator și arată prezența sau absența hemolizei. Dacă serul provine de la un bolnav de sifilis, sistemul antigen-reagină va fixa alexina și hemoliza nu se produce = reacție pozitivă sau fixare. Dacă serul provine de la un individ indemn de sifilis, alexina va rămîne liberă și se va fixa pe cel de-al doilea sistem antigen-anticorp, alcătuit din globule roșii de oaie și ser hemolitic anti-oaie și va produce hemoliza = reacție negativă.

Tehnica reacției Bordet-Wassermann în ser.

Reacția constă în punerea în contact a serului suspect inactivat (30 de minute la 56°, pentru a-i distruge alexina proprie) cu antigenul și alexina de cobai, în anumite proporții determinate prin titrare prealabilă. După o perioadă de contact la temperatura de 37°, se adaugă o suspensie de globule roșii de oaie, cu o doză convenabilă de ser hemolitic de iepure anti-hematii de oaie — sistemul hemolitic. După acest amestec, se termostatează în continuare încă 20–30 de minute la 37°, după care se face citirea reacției (pentru titrarea antigenului, alexinei și prepararea sistemului hemolitic vezi reacția de fixare a complementului).

TABELUL 125

Schema reacției

Tub	1	2	3	4	5	6	7	8
Ser de cercetat inactivat (ml)	0,1	0,2	0,3	—	—	—	—	—
Ser sigur normal (ml)	—	—	—	0,2	—	—	—	—
Ser sigur sifilitic	—	—	—	—	0,2	—	—	—
Diluție de antigen Bordet-Ruelens (ml)	0,2	0,2	—	0,2	0,2	0,4	—	—
Alexină titrată diluată 1/10 (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
Soluție clorurosodică $8,5^{0}/_{00}$ (ml)	1	0,9	1	0,9	0,9	0,9	1,3	1,3
Se menține 1 oră la 37°								
Sistem hemolitic (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
Se menține încă 30 de minute la 37°								

Interpretare. Reacția se pozitivează abia după 3 săptămîni de la apariția șancrului. Notarea intensității reacției se face astfel: ++++ intens pozitiv; +++ pozitiv; ++ pozitiv slab; + sau ± dubios. Tuburile nr. 1 și 2, din tabelul 125 reprezintă reacția propriu-zisă; dacă în aceste tuburi apare hemoliza, atunci reacția este considerată negativă; în cazul absenței hemolizei, reacția este pozitivă. Celelalte tuburi servesc ca martori ai desfășurării reacției în bune condiții. Astfel, în tubul nr. 3 trebuie să fie totdeauna hemoliză; fiind martorul serului de cercetat, nu conține antigen și servește pentru controlul acțiunii anticomplementare a serurilor de cercetat, seruri care fixează singure alexina, în lipsa antigenului. Tubul nr. 4, obligatoriu, hemoliză, reprezintă martorul cu ser sigur negativ. Tubul nr. 5, obligatoriu absența hemolizei, reprezintă martorul cu ser sigur pozitiv. Tubul nr. 6, obligatoriu hemoliză, reprezintă controlul antigenului, care nici în doză dublă decît cea folosită în reacție nu trebuie să fixeze singur alexina, în lipsa serului de cercetat. Tubul nr. 7, obligatoriu hemoliză, reprezintă controlul sistemului hemolitic. Tubul nr. 8, obligatoriu absența hemolizei, reprezintă controlul hematiilor de oaie; soluția clorurosodică 8,5$^0/_{00}$ nu poate avea singură acțiune litică asupra globulelor roșii de oaie.

În afară de metoda de fixare a complementului cu ser inactivat, a cărei schemă am redat-o mai sus, se folosesc de asemenea, în diagnosticul serologic al sifilisului, metode cu ser proaspăt neinactivat, care se bazează pe utilizarea alexinei proprii a serului de cercetat. Astfel de metode, destul de numeroase, se utilizează în practica laboratoarelor care fac examene în serie, sub denumirea diferiților autori care le-au imaginat: reacția Hecht, reacția Levaditi-Latapie, reacția Grigoriev-Rappaport, reacția Muttermilch etc.

Reacțiile de floculare au adus o simplificare importantă în practica serodiagnosticului sifilisului, deoarece ele se realizează numai prin simpla punere în contact a serului de cercetat cu o suspensie la antigen, în anumite proporții. Reacțiile de floculare devin pozitive la 10—12 zile de la apariția șancrului; sînt deci mai precoce. Ele sînt, de asemenea, foarte sensibile, dar uneori mai puțin specifice. Din aceste motive serodiagnosticul sifilisului se face totdeauna folosind, în paralel, pentru același ser de cercetat, 2 reacții de floculare și 1 reacție de fixare a complementului. Serul unui bolnav de sifilis are proprietatea de a flocula cu o suspensie coloidală de lipoizi, așa-zisele antigene nespecifice. Din punctul de vedere al activității serologice, există o mare asemănare între lipoidele extrase din diferite organe cu acelea extrase din corpul treponemelor. În serul bolnavilor de sifilis există substanțe care, acționînd asupra acestor antigene, determină flocularea lor.

Tehnicile reacțiilor de floculare sînt foarte numeroase. În țara noastră se folosesc curent următoarele: reacția Kahn, reacția citocol (Sachs-Witebsky) și reacția Meinicke (M.K.R. II).

Reacția Kahn se folosește sub două forme, reacția standard și reacția prezumtivă, diferite ca antigene și ca rezultate, ultima fiind mai sensibilă, dar mai puțin specifică.

Tehnica standard se practică în 3 tuburi, raportul dintre cantitățile de antigen și serul de cercetat fiind diferit: 1/3, 1/6, 1/12. Antigenul este un extract alcoolic din inimă de bou, epuizat cu eter și cu adaos de colesterol în proporție de 6 g$^0/_{00}$. Pentru fiecare lot de antigen se indică titrul, de exemplu: 1 la 1,2 deci 1 ml extract și 1,2 ml soluție clorurosodică 3%. Diluarea antigenului se face rapid în tuburi mici, turnînd antigenul și soluția clorurosodică 3% una peste alta, de cîteva ori. După o maturare de 10 minute, se repartizează în eprubete de hemoliză cantități diferite de antigen, cu ajutorul unei micropipete de 0,10 ml, conform tabelului 126.

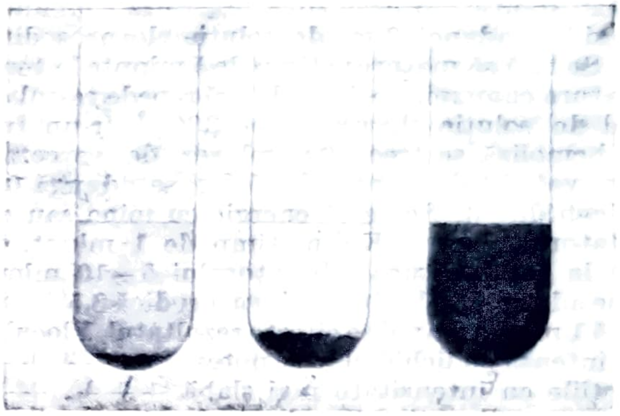


Fig. 342. — Citirea unei reacții Bordet-Wassermann în ser: **Tubul 1** — 0,1 ml ser de cercetat = reacție pozitivă +++; se constată depozit mare de hematii, lichidul de culoare roz denotă ușoară hemoliză. Tubul 2 — 0,2 ml ser de cercetat — reacție intens pozitivă ++++; se constată depozit mare de hematii și lichid limpede; absența completă a hemolizei. *Tubul* **3** — controlul puterii anticomplementare a serului, hemoliză totală = reacție negativă.

TABELUL 126

Nr. tubului	1	2	3
Antigen diluat (ml)	0,05	0,025	0,0125
Ser de cercetat inactivat (ml)	0,15	0,15	0,15
Raportul dintre antigen și ser	1/3	1/6	1/12

Se agită cu un agitator electric tip Kahn, cu ritmul oscilațiilor de 275/min., timp de 3 minute. Se adaugă apoi soluție clorurosodică 8,5$^0/_{00}$, 1 ml în tubul nr. 1 și cîte 0,5 ml în celelalte 2 tuburi. Se mai agită încă 30 de secunde. Citirea rezultatelor se face și cu ochiul liber, dar preferabil cu o lupă sau aglutinoscop. Flocularea este mai accentuată sau mai slabă, iar în funcție de aceasta, se notează rezultatele pozitive de intensități diferite. Serurile care nu floculează sînt negative.

Reacția citocol (*Sachs-Witebsky*)

Antigenul este un extract miocardic concentrat de bou, cu adaos de colesterol, în proporții variind între 3 și 6‰. Antigenul se diluează 1/11 în soluție clorurosodică 3%. Se ia 1 ml antigen și i se adaugă 2 ml de soluție clorurosodică 3%. Se lasă să matureze timp de 5 minute la temperatura camerei, apoi se adaugă repede restul de 9 ml de soluție clorurosodică 3%. Într-un tub de hemoliză se trece 0,2 ml ser de cercetat, inactivat 30 de minute la 56° și se adaugă 0,2 antigen diluat. Se agită energic cu mîna sau cu agitatorul electric Kahn, timp de 1 minut, se lasă la temperatura laboratorului 5—10 minute, se adaugă 1 ml soluție clorurosodică 8,5‰. Se agită 1 minut și apoi se citește rezultatul. Flocularea intensă cu lichid clar se notează cu ++++, reacțiile cu intensitate mai slabă +++, ++, + sau ±. Reacția citocol este foarte sensibilă, dar dă rezultate nespecifice în proporție de 3—4%.

Reacția Meinicke (M.K.R. II; Meinicke Klärungs Reaktion II).

Modul de preparare a antigenului, din extractul de inimă de bou, permite ca în cazul reacției pozitive să apară o limpezire a amestecului în loc de floculare, iar în cazul reacției negative, amestecul de antigen și ser de cercetat rămîne tulbure. Reacția M.K.R. II este foarte sensibilă, dar în același timp dă și o proporție de 2—3% rezultate nespecifice. În scopul de a o face mai puțin sensibilă, se preconizează alcalinizarea soluției de NaCl, cu care se diluează antigenul.

Tehnica reacției. Se face o soluție 3,5% NaCl și se alcalinizează 0,01% cu carbonat de Na. Dacă avem, de pildă, 30 de seruri de cercetat, se iau 15 ml de soluție de NaCl 3,5% alcalinizată și se așază la baia de apă la 55—56°, timp de 5—7 minute, pentru maturare. Antigenul original Meinike se folosește în proporție de 1/10; deci la 15 ml soluție clorurosodică 3,5% se adaugă 1,5 ml antigen. Înainte de amestecare antigenul se așază pentru maturație 10 minute la baia de apă la 56°. Se amestecă apoi atingenul cu soluție NaCl în proporția arătată de, 1,5 ml antigen la 15 ml soluție NaCl. În tuburi mici speciale Meinicke se repartizează 0,2 ml din fiecare ser de cercetat, peste care se adaugă 0,5 ml antigen Meinike diluat și apoi se amestecă prin agitare cu mîna. Eprubetele se lasă la temperatura camerei 24 de ore, după care interval se face citirea.

Există, de asemenea, posibilitatea folosirii reacțiilor de floculare sub formă de microreacții pe lamă, cu citire la microscop sau cu lupa, și care servesc la depistarea serologică în masă a cazurilor de sifilis. Toate cazurile pozitive sau dubioase sînt apoi testate prin metode serologice clasice: reacția de fixare a complementului și 2 reacții de floculare. În anumite cazuri de sifilis tardiv și în sifilisul nervos reacțiile serologice pot fi negative; în asemenea cazuri ca și în aprecierea vindecării după un tratament antisifilitic, se practică reacția Bordet-Wassermann în lichidul cefalorahidian.

Reacția Bordet-Wassermann cu antigen Bordet-Ruelens în lichidul cefalorahidian.

Deoarece lichidul cefalorahidian (l.c.r.) nu conține alexină, nu este necesară inactivarea lui prealabilă 30 minute la 56°. Întotdeauna cînd l.c.r. conține urme de sînge trebuie centrifugat 10 minute la 3 000 t/min., pentru îndepărtarea hematiilor și inactivat 30 de minute la 56°, pentru înlăturarea prezenței alexinei sanguine. Pentru siguranță maximă, unii autori efectuează reacția Bordet-Wassermann cu 2 serii de lichid, proaspăt și inactivat.

Este bine ca reacțiile serologice lichidiene să fie efectuate în maximum 12 ore de la recoltarea lichidului. Datorită faptului că reaginele sînt mai scăzute cantitativ în lichid decît în sînge, vom folosi în reacție volume mai mari de l.c.r. pentru decelarea lor.

Tehnica reacției Bordet-Wassermann în lichidul cefalorahidian. Ingredientele reacției sînt aceleași ca pentru sero-reacție, după următoarea schemă (tabelul 127).

TABELUL 127

Schema reacției Bordet-Wassermann pentru decelarea reaginelor luetice în lichidul cefalorahidian

Nr. tubului	I	II	III	IV	V	VI	VII
Antigen Bordet-Ruelens dil. 1/20 (ml)	0,3	0,3	0,3	—	0,6	—	—
L.C.R. (ml)	0,2	0,5	1	1,3	—	—	—
Alexină dil. 1/10 (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
Soluție clorurosodică 8,5‰ (ml)	0,8	0,5	—	—	0,7	1,3	1,5

Se menține 45 de minute în baia de apă, la 37°

Sistem hemolitic (ml)	1	1	1	1	1	1	1

Se menține în baia de apă la 37° încă 15—20 de minute, pînă apare hemoliză în tuburile IV, V și VI, apoi se face citirea.

Ingredientele reacției se repartizează în ordinea următoare: întîi antigenul Bordet-Ruelens, cîte 0,3 ml în tuburile I, II, III, și V. Se schimbă pipeta și se repartizează lichidul cefalo-rahidian de cercetat în primele 4 tuburi cîte 0,2 ml, 0,5 ml, 1 ml și 1,5 ml. Cu o pipetă curată se repartizează apoi alexina diluată 1/10 și titrată în ziua reacției cîte 0,2 ml în toate tuburile, cu excepția tubului VII. Se aduce la volumul de 1,5 ml amestec pe tub prin adaos de soluție clorurosodică 8,5°/₀₀. Incubația necesară fixării alexinei pe complexul antigen-anticorp este preferabil să se facă în baia de apă la 37°, pentru că se realizează simultan o temperatură uniformă în toate tuburile, esențială pentru buna desfășurare a reacției. După realizarea fixării, se adaugă sistemul hemolitic, cîte 1 ml în fiecare tub al reacției și se menține în continuare la baia de apă, pînă apare hemoliza completă în tuburile IV, V și VI.

Tuburile I, II și III sînt cele ale reacției propriu-zise. Datorită folosirii în reacție a cantităților crescînde de l.c.r. este posibil să obținem pe lîngă indicațiile de ordin calitativ asupra prezenței sau absenței reaginelor și unele indicații asupra cantității reaginelor. Tubul IV reprezintă martorul reacției pentru controlul reaginei, care în lipsa antigenului, nu trebuie să fixeze alexina. Tubul V reprezintă martorul pentru controlul antigenului, care nici folosit în cantitate dublă față de cea folosită în reacție nu trebuie să fixeze nespecific alexina în lipsa reaginei. Tubul VI reprezintă martorul pentru controlul alexinei, care în lipsa reaginei și antigenului trebuie să producă hemoliza sistemului hemolitic. Tubul VII este martorul calității hematiilor, care, în lipsa alexinei trebuie să arate absența hemolizei.

Pentru ca o reacție Bordet-Wassermann în lichid să poată fi citită și interpretată este obligatoriu să existe hemoliză completă în tuburile martor IV, V și VI și absența hemolizei în tubul VII. Rezultatele reacției se interpretează în felul următor:

Reacție negativă, hemoliză completă în primele 6 tuburi ale reacției, cu excepția tubului VII.
Reacție intens pozitivă, absența hemolizei în tuburile I, II, și III cu fixație intensă (amestec limpede cu depozit de hematii pe fund), hemoliză completă în tuburile IV, V și VI, absența hemolizei în tubul VII.

Reacție pozitivă, hemoliză totală în tubul I, hemoliză parțială (amestec de culoare roz, cu depozit mic de hematii) în tuburile II și III, hemoliză completă în tuburile IV, V și VI, cu absența hemolizei în tubul VII.

Reacție slab pozitivă, hemoliză totală în tuburile I și II, hemoliză parțială (amestec de culoare roz cu depozit mic de hematii) în tubul III, hemoliză completă în tuburile IV, V și VI, cu absența hemolizei în tubul VII.
Reacție dubioasă, hemoliză totală în tuburile I și II, hemoliză, îndoielnică în tubul III (amestec de culoare omogen roz, fără depozit de hematii), hemoliză completă în tuburile IV, V și VI, cu absența hemolizei în tubul VII.

Reacția Bordet-Wassermann în lichidul cefalorahidian se completează cu 2 reacții de floculare. Obișnuit folosim reacțiile MKR II și citocol.

Reacția Meinicke Klärungs II. Se efectuează în 3 tuburi:
— tubul I = 0,5 ml l.c.r. + 0,1 ml antigen MKR II diluat;
— tubul II = 0,2 ml l.c.r. + 0,1 ml antigen MKR II diluat;
— tubul III = 0,1 ml l.c.r. + 0,2 ml antigen MKR II diluat.

Prepararea antigenului se face întocmai ca pentru reacția MKR II cu ser sanguin. Antigenul maturat și diluat se repartizează în cele 3 tuburi ale reacției, se agită cu mîna și se așază în stelaj, la temperatura camerei. Citirea se face după 22—24 de ore. În tuburile negative se constată pe fundul tubului un depozit de formă concavă de culoare albăstruie, cu supernatant opalescent. În cele pozitive apare un depozit fin, albicios, cu lichidul supernatant limpede. Cînd depozitul albicios cu lichidul supernatant limpede apare în toate 3 tuburile, reacția este intens pozitivă, cînd apare numai în două tuburi, este pozitivă și într-unul singur, slab pozitivă. Uneori, la lichidele intens pozitive poate să apară o floculare paradoxală (lipsa floculării în tubul I), datorită fenomenului de „prezonă". Pentru a putea face o citire corectă se reface reacția amestecînd în prealabil 0,1 ml l.c.r. cu 0,1, ml ser sigur negativ și apoi se adaugă 0,5 ml antigen diluat. Dacă rezultatul reacției este pozitiv, atunci avem confirmarea că este vorba de un lichid cefalorahidian intens pozitiv care a prezentat fenomenul de prezonă.

Reacția citocol în lichidul cefalorahidian se practică după inactivarea prealabilă a lichidului 30 de minute la 56°. Într-un tub se adaugă la 0,5 ml l.c.r. 0,1 ml antigen citocol diluat ca pentru ser, se agită 3 minute în stelajul metalic și apoi se face citirea ca la serul sanguin.

Interpretarea rezultatelor serologiei lipoidice în diagnosticul sifilisului. Decelarea reaginelor luetice rămîne negativă în perioada de incubaţie a bolii şi în perioada primară. Spre sfîrşitul perioadei primare, aproximativ din a 15-a zi de şancru, reaginele încep să apară. Reacţiile serologice lipoidice sînt frecvent negative în sifilisul terţiar, mai ales în cazul gomelor viscerale profunde. În sifilisul latent, tardiv, reacţiile serologice se pot menţine negative.

În perioada de sfîrşit a sifilisului primar, reacţia MKR II este prima care se pozitivează, urmată de celelalte reacţii de floculare şi abia după 8—10 zile de reacţia de fixare a complementului. În perioada secundară, toate reacţiile serologice sînt constant pozitive. În urma unui tratament antiluetic intens, reacţiile serologice se negativează în ordinea inversă a apariţiei lor, întîi reacţia B.W. şi apoi cele de floculare. Dintre acestea, ultimele care se negativează sînt reacţia Kahn şi Meinicke. Recidivele datorită întreruperii sau insuficienţei tratamentului se însoţesc de reapariţia serologiei pozitive. În formele clinice de sifilis latent şi tardiv adeseori rezultatele sînt discordante şi contradictorii; în general pozitivitatea lor descreşte procentual, pe măsură ce infecţia luetică se învecheşte. În unele cazuri, deşi tratamentul antiluetic a fost aplicat corect, intens şi precoce, totuşi reacţiile serologice lipoidice rămîn constant pozitive. Acestea sînt cazurile denumite cu serologie ireductibilă a căror vindecare clinică nu poate fi stabilită decît prin metode care decelează anticorpii specifici în ser şi lichidul cefalorahidian.

În aprecierea eficienţei tratamentelor antiluetice prin serologie lipoidică se foloseşte în prezent tehnica evaluării cantitative a reaginelor, care trebuie să completeze reacţia de fixare a complementului clasică, calitativă.

Reacţia de imobilizare a treponemelor.

Nelson şi Mayer, în 1949, au preconizat o nouă reacţie de diagnostic în sifilis, de mare specificitate, care pune în evidenţă, în serul bolnavilor de sifilis, existenţa anticorpilor imobilizanţi ai treponemelor. Principala dificultate a acestei reacţii ţine, pe de o parte, de folosirea obligatorie a unei anumite tulpini de treponeme, tulpina Nichols, care se întreţine prin orhită experimentală în serie la iepure şi pe de altă parte, de faptul că treponemele izolate din testicul îşi păstrează mobilitatea intactă o perioadă limită de timp, între 50 şi 80 de ore, în mediul sintetic de întreţinere Nelson.

Tehnica reacţiei constă în punerea în contact a serului de cercetat (în cantitate de 0,05 ml) cu antigenul, o suspensie de treponeme mobile, tulpina Nichols, (0,3 ml). Se incubează la 37° şi după 8 ore se adaugă 0,15 ml complement, diluat după titru şi se incubează în continuare la termostat încă 12 ore.

Serul de cercetat trebuie să fie proaspăt, deoarece anticorpii imobilizanţi dispar destul de rapid, încît după 24 de ore de la recoltare se mai găsesc în proporţie de 50%, iar după 48 de ore nu se mai găsesc. Aceeaşi precauţie trebuie respectată şi cînd se cercetează imobilizinele în lichidul cefalorahidian. În momentul practicării reacţiei, serul se inactivează 30 de minute la +56°. Dacă bolnavul a urmat un tratament recent cu penicilină, care s-ar mai putea găsi în ser şi ar acţiona asupra mişcărilor treponemelor, se adaugă 0,1 ml penicilinază la fiecare mililitru de ser de cercetat. După 18 ore de menţinere la termostat, se face citirea în felul următor: cu o ansă sterilă de platină se recoltează o picătură din tubul de reacţie şi o altă picătură din tubul martor, se aşază alături pe aceeaşi lamă şi se acoperă fiecare cu cîte o lamelă. Se examinează la microscopul cu cîmp întunecat şi se numără treponemele imobilizate şi cele mobile. Rezultatul se exprimă cifric, de exemplu: 100% treponeme imobilizate = rezultat pozitiv intens; 50—90% treponeme imobilizate = rezultat pozitiv; între 20 şi 50% treponeme imobilizate = rezultatul este îndoielnic, dubios. Se poate face reacţia peste cîteva zile. Sub 20% treponeme imobilizate, rezultatul este considerat negativ. La martori trebuie să se păstreze mobilitatea treponemelor în proporţie de cel puţin 90%; sub 70%, se repetă întreaga reacţie.

Interpretarea testului de imobilizare a treponemelor. Testul Nelson devine pozitiv la sfîrşitul sifilisului primar, abia după a 20-a zi de la şancru şi uneori la începutul sifilisului secundar. Deşi, reacţia de imobilizare a treponemelor nu este o reacţie precoce de depistare a luesului şi adesea reacţiile serologiei lipoidice devin pozitive mult înaintea celei de imobilizare.

O dată cu apariţia anticorpilor imobilizanţi în sînge, titrul lor creşte continuu şi se menţine ridicat tot timpul bolii, dacă nu se intervine cu tratamentul antiluetic. În sifilisul secundar reacţia de imobilizare şi reacţiile serologice lipoidice sînt constant pozitive. În perioada terţiară a sifilisului cu leziuni viscerale şi în formele latente, tardive, de lues, reacţia de imobilizare a treponemelor se menţine intens şi constant pozitivă. În formele clinice de neurosifilis, medular şi cerebral, imobilizinele sînt constant prezente în sîngele şi lichidul cefalorahidian al bolnavilor.

Anticorpii imobilizanţi sînt foarte rezistenţi la acţiunea tratamentului antiluetic. Spre deosebire de reacţiile serologice lipoidice, care se amendează sub acţiunea unui tratament intens, titrul imobilizinelor scade numai dacă tratamentul antiluetic a fost aplicat precoce. Chiar aplicat în perioada preserologică, tratamentul antiluetic nu poate opri apariţia imobilizinelor, deşi reaginele pot să nu mai apară.

În cazurile cînd serologia clasică a fost pozitivă la începutul tratamentului, titrul anticorpilor imobilizanţi se menţine constant ridicat vreme îndelungată după negativarea serologică clasică.

Valoarea diagnostică deosebită a reacţiei de imobilizare a treponemelor constă în specificitatea ei. Reacţia de imobilizare a treponemelor s-a dovedit a fi pînă în prezent constant negativă în toate cazurile, în afara sifilisului, în care reacţiile serologiei lipoidice au dat reacţii fals pozitive.

Singura treponematoză în care s-au putut decela imobilizine este ,,pianul'', al cărui agent etiologic, *Treponema pertenue*, este înrudit antigenic cu *Treponema pallidum*.

Reacţia de imobilizare a treponemelor fiind foarte laborioasă, chiar în laboratoarele de specialitate se execută numai o dată pe săptămînă.

În practica diagnosticului de laborator al sifilisului, reacţia de imobilizare a treponemelor este folosită în cazurile litigioase, cu serologie clasică pozitivă, dar fără antecedente de sifilis la indivizii cu semne sigure de sifilis visceral, cardiac, nervos etc. şi cu serologie clasică negativă ; de asemenea şi în unele cazuri de sifilis congenital. În sifilisul congenital, imobilizinele, întocmai ca şi reaginele, pot trece pasiv prin placentă de la mamă la copil, ulterior dispărînd. În aceste cazuri trebuie repetate o dată pe lună reacţiile de imobilizare, în primele luni de la naşterea copilului. Niciodată nu s-a întîlnit o reacţie de imobilizare pozitivă în lichid şi negativă în ser ; deci, în cazurile în care în ser reacţia este negativă, nu mai este necesară cercetarea imobilizinelor în lichidul cefalorahidian. Pe baza cercetărilor făcute de Nelson şi Mayer, privind obţinerea şi folosirea treponemelor patogene ca antigene specifice (tulpina Nichols), s-au imaginat şi alte reacţii specifice antigen-anticorp, pentru diagnosticul de laborator al sifilisului. Dintre acestea, două reacţii au perspective de a fi utilizate în viitor ca reacţii practice de diagnostic : reacţia de aglutinare a treponemelor şi reacţia de imunoaderenţă a treponemelor.

Diagnosticul de laborator al sifilisului

Schemă de diagnostic

Produsul patologic se recoltează în funcţie de etapa evolutivă a infecţiei luetice.

A. *Sifilis primar şi secundar*

- Recoltarea cu o pipetă Pasteur fin efilată a exsudatului din leziunea de şancru primar. Exsudatul se examinează direct între lamă şi lamelă, la microscopul cu cîmp întunecat şi după efectuarea a două frotiuri colorate după metoda de impregnare argentică Fontana-Tribondeau şi Giemsa prelungit.
- Recoltarea exsudatului din leziunile de lues secundar, rozeolă şi plăci mucoase. Exsudatul se examinează direct şi după colorarea frotiurilor ca mai sus. Atenţie la examenul exsudatului din plăcile mucoase de la nivelul mucoasei bucale şi faringo-amigdaliene, datorită posibilităţii de confundare cu treponemele parazite nepatogene ale cavităţii bucale, treponemele *micro-* şi *macrodentium*.
- Recoltarea sîngelui periferic prin puncţie venoasă în vederea decelării reaginelor şi anticorpilor treponemici în serul de cercetat. Apariţia reaginelor fiind cea mai precoce se va asocia sistematic, din a treia săptămînă de existenţă a şancrului, la examenul direct al treponemelor din exsudat şi reacţiile serologice de decelare a reaginelor antiluetice R.B. — W. şi două reacţii de floculare. Dintre reacţiile de floculare este obligatorie folosirea MKR II asociată cu reacţia citochol sau Kahn prezumtiv. Decelarea anticorpilor imobilizanţi prin testul Nelson nu poate fi folosită decît după 21 de zile de la apariţia şancrului. În sifilisul secundar, decelarea reaginelor cu antigene cardiolipinice este suficientă ca mijloc de diagnostic practic.

B. *Sifilisul visceral*

- Decelarea reaginelor rămîne reacția de bază pentru diagnosticul sifilisului visceral și neurosifilisului. Alături de decelarea reaginelor în serul bolnavului este necesar să se efectueze reacțiile R. B. — W. și de floculare în lichidul cefalorahidian.
- În cazurile de sifilis visceral tardiv și neurosifilis, cînd reacțiile pentru decelarea reaginelor pot fi fals-negative sau discordante, este necesar să se completeze diagnosticul serologic prin decelarea anticorpilor imobilizanți, prin testul Nelson și Mayer.

C. *Sifilisul tratat*

- Controlul eficacității tratamentului antiluetic se efectuează prin examene serologice repetate calitative și cantitative. În practica tratamentului antiluetic, urmărirea reaginelor antisifilitice prin R. B. W. și reacțiile de floculare constituie metoda cea mai larg utilizată. Reacția de fixare a complementului este prima care se negativează sub influența tratamentului, urmată de reacțiile de floculare. În ultimii ani s-a impus tot mai mult metoda aprecierii cantitative a prezenței reaginelor prin reacții de fixare a complementului cantitative după tehnica Kolmer sau Demanche. În felul acesta, prin aprecierea descreșterii titrului reaginelor antiluetice se obțin informații mai judicioase asupra evoluției și eficacității tratamentului antisifilitic aplicat.

În toate cazurile de vindecare după un tratament antiluetic intens, cu reacțiile serologice cu antigene lipidice constant negative în ser și lichidul cefalorahidian, concluzia vindecării definitive o poate da numai testul Nelson, care efectuat în lichid trebuie să fie constant negativ un an de zile după încheierea tratamentului.

În cazurile cu serologie lipoidică ireductibilă și în alte situații controversate, numai decelarea anticorpilor imobilizanți poate clarifica diagnosticul.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU *BORELLIA*

Familia: *Treponemataceae*. Genul: *Borellia*. Specia tip: *Borellia recurentis*.

Generalități

Borellia recurentis, descoperită de Obermayer, în 1873, determină la om febra recurentă, o boală infecțioasă necontagioasă, transmisibilă de la om la om prin păduchele de corp sau cap. Din punct de vedere clinic, se caracterizează printr-o serie de accese febrile, alternate cu perioade de apirexie.

Omul se îmbolnăvește de febră recurentă europeană cînd păduchii infectați îl parazitează, iar *Borellia* este inoculată prin înțepătura insectei sau în urma strivirii păduchelui pe piele și excoriația epiteliului cutanat prin scărpinare. În diferite regiuni ale globului se întîlnesc forme autohtone de febră recurentă care sînt transmise prin acarieni din genul *Ornitodorus*: *B. duttoni-Ornitodorus moubata*, în Africa tropicală; *B. hispanica — Ornitodorus erraticus*, în Africa spaniolă; *B. venezuelensis — Ornitodorus venezuelensis* în America etc. La păsări se întîlnesc infecții asemănătoare, produse de *Borellia galinarum*, *Borellia anserina* etc.

Habitat

Microbul este strict parazit și se găsește numai în organismul bolnavului, în sînge, lichidul cefalorahidian și în țesuturi, mai ales în sistemul nervos. *Borellia* prezintă în organismul bolnavului un ciclu evolutiv. În momentul fazei febrile găsim microbul în sîngele periferic; în perioada de apirexie el dispare complet din sîngele periferic și se retrage în sîngele visceral, ca să reapară o dată cu noul acces febril.

Morfologie și caractere de cultură

Microbi cu corpul spiralat, de 8—15 μ lungime, cu spire laxe, mobile, flexibile, neregulate, cu capetele subțiate, care se divid transversal. În stare de repaus, corpul microbului este liniar sau ușor ondulat. Se colorează gram-negativ. Se colorează mai bine cu colorație Giemsa. Se cultivă anevoie și numai în anaerobioză pe sînge citratat uman sau de șobolan. Izolarea din produsul patologic se face și prin însămînțarea cîtorva picături de sînge pe membrana corioalantoidă a oului embrionat de găină, după tehnica Levaditi.

Infecția experimentală

Sîngele bolnavilor, recoltat în faza de pirexie și inoculat la maimuță, provoacă o febră recurentă tipică. Inocularea intraperitoneală la cobai, șobolan, hamster și șoarece provoacă o infecție septicemică mortală în cîteva zile. În laborator se folosește metoda trecerilor de la șoarece la șoarece prin inocularea sîngelui pe cale intraperitoneală, pentru a întreține o tulpină izolată de la bolnav.

Diagnosticul de laborator

Produsul patologic de examinat este sîngele periferic în perioada febrilă.

A. **Examen direct**: recoltarea unui frotiu de sînge periferic în picătură groasă și colorarea lui prin metoda Giemsa.

B. **Examen indirect**: inocularea a 2 cm de sînge de bolnav intraperitoneal la șoarecele alb și recoltarea, tot la 24 de ore, a cîtorva picături de sînge din coada șoarecelui și examinarea lor între lamă și lamelă la microscopul cu cîmp întunecat. Reacția de fixare a complementului cu serul bolnavului și antigen borellian este pozitivă, dar uneori nespecifică. Reacția de borellioliză strict specifică se bazează pe apariția, după 12—16 zile de boală, în sîngele bolnavului, în perioadele afebrile, a unor anticorpi cu acțiune litică asupra borelliei, borelliolizinele. Reacția de borellioliză îngăduie identificarea serologică a diferitelor variante de *Borellia.* Acești anticorpi persistă cel puțin un an după boală și îngăduie astfel și un diagnostic retrospectiv.

Diagnosticul bacteriologic și serologic poate fi completat printr-o leucogramă care indică obișnuit o hiperleucocitoză în jurul a 15—20 000 leucocite/mm^3, cu polimorfonucleoză neutrofilă, tendință la bazofilie și hipoeozinofilie în formula leucocitară. În fazele de apirexie apare o mononucleoză în formulă.

Diagnosticul de laborator al infecției prin asocierea fusospirochetică

În 1898, Vincent a descris un organism spiralat, al cărui rol patogen este dificil de precizat, deoarece nu se întîlnește decît asociat cu bacilul fusiform în asocierea fusospirochetică, care determină la om angina Plaut-Vincent, o stomatită ulceromembranoasă. Această asociere se întîlnește și în ulcerul fagedenic al țărilor calde și în noma.

Borellia vincenti este o spirochetă de 12—15μ lungime, cu ondulații largi, care se colorează gram-negativ și n-a putut fi izolată în cultură pură. Puterea sa patogenă nu a putut fi relevată decît în asociere cu bacilul fusiform, un microb comensal din flora cavității bucale, cu corpul ascuțit la extremități și ușor îngroșat la mijloc, gram-negativ. În cazul scăderii rezistenței locale a mucoasei bucale, din motive încă insuficient cunoscute, se creează condiții favorabile pentru exacerbarea florei comensale și asocierea simbiotică fusospirochetică, obișnuit la limita saprofitismului, se înmulțește considerabil și provoacă o stomatită Vincent.

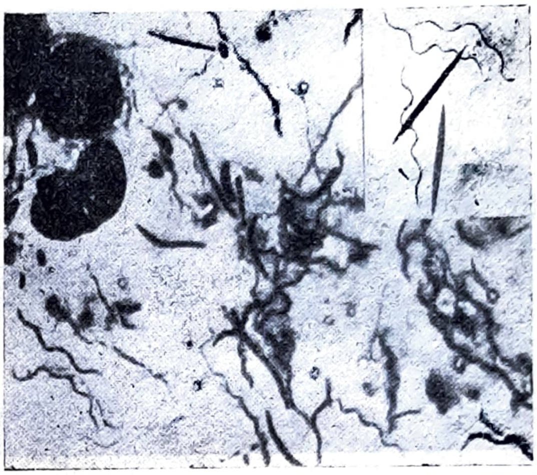


Fig. 343. — Angina Plaut-Vincent. Frotiu din exsudat faringian. Asociație de bacili fuziformi și *Borelia vincenti* (colorație Gram).

Diagnosticul de laborator este ușor de realizat, prin efectuarea unui frotiu pe lamă din secreția unei ulcerații. Prin colorația Gram se recunoaște cu ușurință la microscop asocierea de bacili fusiformi și spirochete.

Tratamentul stomatitei ulceromembranoase Plaut-Vincent se face prin badijonaj local cu penicilină sau neosalvarsan. Profilaxia se realizează prin menținerea unei bune igiene a cavității bucale și folosirea aerosolilor cu penicilină ori de cîte ori apare o congestie sau o eroziune a mucoasei.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LEPTOSPIROZELOR

Familia: *Treponemataceae.* Genul: *Leptospira.* Specia tip: *Leptospira icterohaemorrhagiae* Noguchi.

Generalități

Leptospirozele constituie un grup de boli infecțioase, caracterizate prin: debut brusc, febră, uneori icter și mai totdeauna atingere renală. Ele au tendința la recidivă și adesea se complică cu meningită. Sînt provocate de microorganisme spiralate subţiri, denumite leptospire, (leptos = subţire).

Clasificare. Din punct de vedere serologic se cunosc peste 40 de tipuri, cele mai importante fiind : *Leptospira ictero-haemorrhagiae*, care produce boala Weil-Vasiliev ; *L. canicola*, responsabilă de tifosul canin ; *L. pomona*, întîlnită frecvent la porci ; L. *hebdomadis* (febra de 7 zile) ; L. *grippotyphosa*, agentul cauzal al febrei de apă etc.

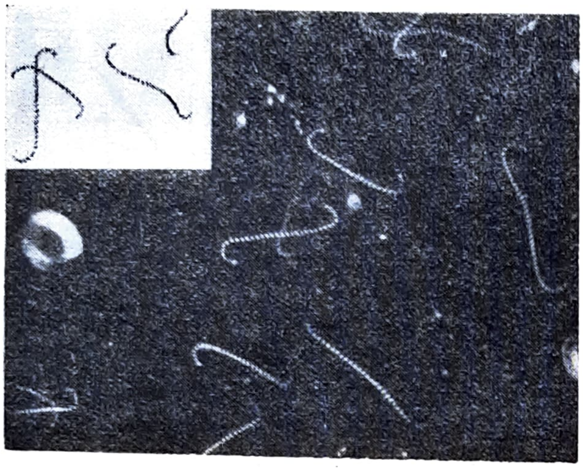


Fig. 344. — Leptospire în sînge. Examenul microscopic pe fond întunecat.

Ţinînd seama de sindromul cel mai grav, care este icterul, leptospirele se împart în : leptospire icterigene şi leptospire anicterigene. Din prima categorie face parte *L. ictero-haemorrhagiae*, iar în a doua categorie intră majoritatea tipurilor serologice descrise.

Se mai cunosc leptospire nepatogene, care se dezvoltă în apele naturale : *L. biflexa* şi *L. aquicola* :

- Leptospire
  - patogene
    - *icterigene*: *L. ictero-haemorrhagiae*
    - anicterigene
      - *L. canicola*
      - *L. pomona*
      - *L. hebdomadis*
      - *L. grippotyphosa*
      - *L. autumnalis*
      - *L. seiroe*
      - *L. poi*
      - *L. hyos*
      - *L. australis*
      - *L. bataviae*
  - nepatogene
    - *L. aquicola*
    - *L. biflexa*

Morfologie

Leptospirele, examinate pe cîmp întunecat, se prezintă în formă de spirale lungi, de 5—14μ, subţiri şi cu numeroase spire, fixe, regulate şi rigide. Capetele leptospirei sînt încovoiate în formă de cîrlig. Sînt extrem de mobile, prezentînd mişcări de alunecare înainte şi înapoi, precum şi mişcări de rotaţie în jurul axului longitudinal, asemănătoare mişcării de sfredelire. Nu posedă flageli sau cili şi mişcarea se datoreşte prezenţei unui axostil rigid, situat extern membranei citoplasmatice şi aderent la ea.

Leptospirele, indiferent de tipul lor, seamănă foarte mult între ele, astfel că o diferenţiere pe bază morfologică este practic imposibilă. Ele sînt greu colorabile prin coloranţii obişnuiţi de anilină, caracter care le apropie de treponeme. Pentru a le pune în evidenţă, se utilizează coloraţia Giemsa prelungită la rece, timp de 12—24 de ore, sau la cald, timp de 1 oră la 37°, impregnaţia argentică după metoda Fontana-Tribondeau şi coloraţia de contrast cu roşu de Congo sau tuş de China. Pentru coloraţia cu roşu de Congo, se pune o picătură de cultură de leptospire pe o lamă, se amestecă bine cu o picătură de roşu de Congo şi se face un frotiu. Se toarnă alcool acidulat 1%, se usucă şi se examinează cu obiectivul cu imersie.

Caractere de cultură

Leptospirele se cultivă relativ uşor, în condiţii de aerobioză, pe medii lichide, care conţin ser de iepure în proporţie de 7—10%. Temperatura optimă este de 28°, la pH uşor alcalin (7,2—7,4). Mediile cele mai folosite sînt :

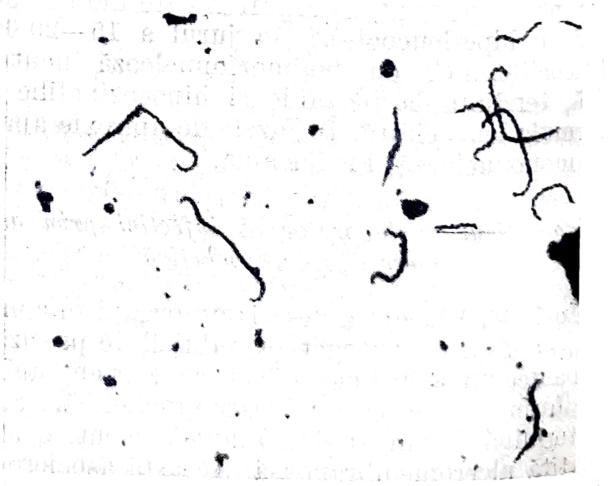


Fig. 345. — Leptospire, frotiu de cultură, impregnare argentică, prin metoda Fontana-Tribondeau.

1. Mediul Uhlenhut : apă de fîntînă sterilă cu 10% ser inactivat de iepure.

2. Mediul Terskih : soluţie tampon + 7—10% ser inactivat de iepure.
3. Mediul Korthoff : soluţie-tampon, peptonă Witte, apă distilată şi 7—10% ser inactivat de iepure.

Mediile pe care se dezvoltă leptospirele rămîn limpezi, datorită transparenţei corpului bacterian. Examinarea culturilor se poate face numai prin microscopie pe cîmp întunecat. Leptospirele apar ca nişte filamente strălucitoare, în contrast cu fondul întunecat al cîmpului microscopic. Incubaţia culturilor şi urmărirea lor se face, în general, timp de 7—14 zile.

Sînt puţin rezistente în mediul extern; uscăciunea, căldura şi aciditatea le omoară repede.

Structura antigenică

Leptospirele sînt organisme cu o structură antigenică complexă. Există o diferenţă netă între structura antigenică a leptospirelor saprofite şi a celor patogene. Se cunosc astăzi 2 componente antigenice majore la leptospire. Una este un antigen de suprafaţă, de natură polizaharidică complexă şi conferă specificitatea de tip, iar cea de-a doua este un antigen somatic de natură lipopolizaharidică, care conferă microbului specificitatea de grup. S-au mai pus în evidenţă încă 3 antigene secundare, situate la suprafaţa celulei microbiene, care ar explica relaţiile strînse serologice dintre diferitele tulpini de leptospire. Clasificarea după structura antigenică a îngăduit folosirea ei în scop de diagnostic, sub forma reacţiei de aglutinare-liză a leptospirelor, a reacţiei de fixare a complementului şi a reacţiei de hemaglutinare cu eritrocite sensibilizate cu extracte de leptospire.

Infecţia experimentală

Animalul de elecţie este cobaiul tînăr, sub 200 g, sau hamsterul auriu. Inocularea se face pe cale intraperitoneală şi după o incubaţie variabilă de la 2 la 8 zile, cobaiul face o boală febrilă, însoţită sau nu de icter, în raport cu tipul de leptospiră inoculată. Sînt caracteristice congestia ficatului şi rinichiului şi hemoragiile pulmonare sub forma de pete hemoragice, rotunde, pe care le găsim de regulă în leptospiroza experimentală.

Rezervorul de virus în natură este reprezentat de rozătoare, mai ales şobolanul de canal şi şoarecele de cîmp; de asemenea, animalele domestice, cîinele, porcinele, bovideele etc.

Infecţia la om

Omul se îmbolnăveşte de leptospiroză prin contactul direct cu animalele bolnave sau purtătoare de leptospire şi indirect, prin apa sau alimentele contaminate cu leptospire. Infecţia umană îmbracă o diversitate de forme clinice, de la cele mai grave cu sindrom hemoragic şi icteric, pînă la cele mai uşoare, uneori simple stări febrile care trec neobservate. Din cauza polimorfismului simptomatologiei clinice, adeseori diagnosticul nu poate fi pus decît cu ajutorul laboratorului. Din punctul de vedere al patogeniei, infecţia cu leptospire se caracterizează printr-o fază de început febrilă, cu o durată de 5—8 zile şi care corespunde unei septicemii cu leptospire. Leptospirele pătrund în organismul uman prin mucoasele intacte şi pielea lezată. Ele se înmulţesc la nivelul sistemului reticuloendotelial, de unde pătrund în circulaţie, fapt care coincide cu debutul clinic al bolii. Leptospiremia durează aproximativ o săptămînă.

Cea de a doua fază a infecţiei începe după o săptămînă de boală, cînd leptospirele părăsesc circulaţia generală şi se localizează în organe. Această etapă a infecţiei se caracterizează prin scăderea febrei şi apariţia anticorpilor în umorile organismului şi eliminarea leptospirelor prin urină. În faza de localizare viscerală, leptospirele se găsesc preponderent în ficat şi rinichi. Leptospiruria durează timp de mai multe săptămîni, chiar şi după vindecarea clinică a bolnavului.

Leptospirele icterigene sînt reprezentate de specia tip *L. icterohaemorrhagiae*; aceasta produce la om o boală gravă, cu temperatură mare, icter, hemoragii şi leziuni renale. Mortalitatea este ridicată, aproape de 30%. Cobaiul tînăr, inoculat cu sînge de la bolnav în prima săptămînă de boală, face un icter hemoragic cu evoluţie lentă. La necropsia cobaiului se constată o coloraţie galbenă a mucoaselor şi a ţesutului celular, hemoragii viscerale mai ales la nivelul plămînilor, unde apar zone congestive hemoragice de formă rotundă, perfect delimitate, cu aspect caracteristic de aripă de fluture. Rezervorul de virus este şobolanul de canal, *Rattus norvegicus*.

Leptospirele neicterigene sînt reprezentate de specia tip *L. grippotyphosa*. Acestea provoacă boli neicterigene, cu evoluţie benignă şi mortalitate aproape nulă. Leptospiroza cea mai răspîndită în ţara noastră este

„febra de apă'', care este produsă de *L. grippotyphosa*. Ea se manifestă clinic ca o gripă cu debut brusc, febră, cefalee, congestie conjunctivală și dureri musculare generalizate. Adesea se poate însoți de atingere meningiană. Cobaiul, inoculat cu sînge de bolnav care conține *L. grippotyphosa*, face o boală febrilă, după care se vindecă, rămînînd excretor de leptospire prin urină. Plămînul prezintă leziuni asemănătoare cu cele descrise la *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Sensibilitate la antibiotice și chimioterapice

Majoritatea antibioticelor sînt active. Penicilina, streptomicina și aureomicina dau cele mai bune rezultate, cu condiția să fie administrate cît mai precoce și cît timp bolnavul se găsește încă în faza leptospiremică.

Diagnosticul de laborator al leptospirozelor

Se efectuează în concordanță cu stadiul evolutiv al infecției. În prima săptămînă de boală, în stadiul septicemic, se recoltează steril, prin puncție venoasă, sînge în proporție de 9 ml sînge la 1 ml soluție 1% oxalat de K. Este necesar ca hemocultura să se repete timp de 3 zile consecutiv, pentru a asigura șansele maxime de decelare a leptospirelor din circulația generală. Cu sîngele recoltat pe oxalat de K se vor face următoarele operații:

1. Frotiuri colorate cu metoda Giemsa, timp prelungit; frotiurile se fixează 5—10 minute cu alcool metilic și apoi sînt așezate într-o baie conținînd soluție Giemsa, în diluție de o picătură și jumătate la 1 ml apă neutră. Aici rămîn 12—24 de ore la temperatura camerei, de 22°. Uneori se obțin rezultate mai bune prin dublă colorare rapidă cu soluții proaspete de colorant Giemsa la temperatura de 37°.

Frotiurile de sînge uscate și nefixate se introduc direct în baia de colorant Giemsa încălzită la 37° și se mențin la această temperatură timp de 30 de minute. Se scot apoi lamele din baia de colorant și se spală cu apă de robinet, apoi se reintroduc pentru 30 de minute într-o nouă baie de colorant preparat proaspăt. Se spală, se usucă și se examinează cu obiectivul de imersie. Leptospirele apar colorate roz-roșcat și dacă colorația a reușit, se observă și spirele fine regulate și capetele îndoite în formă de cîrlig.

2. Însămînțări pe medii speciale Korthoff sau Terskih. Însămînțarea se face cu o pipetă Pasteur sterilă, însămînțînd în 6 tuburi cu mediu cantități crescînde de sînge citratat, ca de pildă, 1, 2, 4, 6, 8 și 10 picături. În felul acesta se realizează în culturi o densitate variabilă de leptospire, fapt care are importanță practică la examenul culturilor la microscopul cu cîmp întunecat. Culturile se incubează la temperatura optimă de 28—30°, timp de cel puțin 60 de zile. Controlul culturilor se efectuează din 5 în 5 zile, începînd din a 5-a zi de incubație, printr-un control macroscopic și microscopic. Mediile care la controlul macroscopic prezintă opalescență denotă contaminarea lor secundară și vor fi eliminate pentru că flora supraadăugată inhibează creșterea leptospirelor. Culturile rămase limpezi se controlează pentru prezența creșterii prin examen microscopic la microscopul cu cîmp întunecat. Pentru acest examen se înlocuiește condensatorul microscopic obișnuit cu un condensator cardioid. Pentru controlul creșterii se recoltează, cu bucla unei anse bacteriologice, sterilizată anterior prin flambare, o picătură dintr-un tub de cultură și se depune pe o lamă de microscopie, subțire și curată. Pe dosul lamei se notează cu dermatograful numărul tubului de cultură într-un mic cerc. Pentru controlul culturilor nu este necesar să folosim obiectivul de imersie, ci doar unul din obiectivele uscate 20 × sau 40 × și un ocular 15 ×. Nu vom uita să depunem o picătură de ulei de cedru sau preferabil glicerină între lentila condensatorului și lama cu cultură. Deoarece folosim obiectivele uscate nu este necesară acoperirea picăturii de cultură cu o lamelă, așa că pe o singură lamă putem efectua controlul a 4—5 tuburi de cultură dintr-odată.

Prezența leptospirelor în cîmpul microscopic denotă pozitivitatea culturii. Din toate tuburile care s-au dovedit pozitive, se vor efectua subculturi pe alte 3 tuburi cu mediu. În funcție de intensitatea leptospiremiei bolnavului, vom putea decela culturi pozitive începînd din a 4-a — a 5-a zi de cultivare sau abia după 4—6 săptămîni.

3. Inocularea la cobai. Se folosesc numai cobai tineri de 150—200 g, care se inoculează cu 4 ml sînge oxalatat pe cale intraperitoneală.

Animalele inoculate se păstrează în borcane etichetate cu data inoculării, cantitatea şi felul inoculului. Controlul lor se va face zilnic, prin termometrizare. Toate manipulările animalelor infectate experimental, inclusiv termometrizarea se vor face numai cu mănuşi de cauciuc. Borcanele vor fi dezinfectate cu soluţii acide şi apoi spălate.

Controlul apariţiei leptospiremiei la animalul inoculat se poate face a 2-a zi după inoculare în exsudatul peritoneal care se extrage prin puncţie, cu o pipetă Pasteur efilată. Deoarece însă prezenţa leptospirelor în exsudat coincide cu apariţia septicemiei, se preferă recoltarea directă a sîngelui prin puncţie cardiacă aseptică, care se practică la apariţia primului puseu febril (temperatura peste 39°,5). Sîngele de la animal se însămînţează şi se examinează direct prin frotiuri colorate cu Giemsa. Este util, pentru a mări şansele de izolare a leptospirelor, să repetăm de 2—3 ori hemoculturile din cord în perioada febrilă a animalului.

Dacă animalul inoculat moare în primele zile după debutul febrei, se va efectua necropsia cît mai repede. După notarea leziunilor macroscopice, mai ales la plămîn, se va recolta sînge oxalatat din inimă prin puncţie aseptică cu o seringă sterilă, după cauterizarea prealabilă cu o spatulă încălzită a locului de puncţie. Cu sîngele se vor efectua însămînţări, examen direct şi eventual inoculări intraperitoneale la alt cobai. De asemenea se vor recolta fragmente din rinichi şi ficat care se vor depune într-o cutie Petri sterilă şi se vor tăia în fragmente mici. Cu aceste fragmente se vor efectua însămînţări, examene directe şi eventual inoculări intraperitoneale la animale sănătoase.

Atunci cînd cobaiul inoculat face o infecţie uşoară şi supravieţuieşte, leptospirele apar şi în urină, spre sfîrşitul perioadei febrile. Izolarea lor din urină este mai dificilă datorită acţiunii nocive a pH urinar acid asupra leptospirelor şi se preferă sacrificarea animalelor prin sîngerare aseptică din cord, urmată de însămînţări, examene directe şi inoculări.

4. Se poate executa şi un examen direct al sîngelui recoltat prin hemocultură, pentru prezenţa leptospirelor. Sîngele oxalatat rămas este lăsat să sedimenteze într-un tub de aglutinare timp de 60 de minute pe masa laboratorului, apoi se ia cu ansa bacteriologică o picătură din supernatant, care se depune pe o lamă de microscopie subţire, curată şi fără zgîrieturi. Se acoperă cu o lamelă subţire şi curată şi se examinează la microscopul cu cîmp întunecat cu obiectivul 45 × sau 65 × şi ocular 10—15 ×.

În cazul în care bolnavul de leptospiroză prezintă şi fenomene meningiene şi se recoltează lichid cefalorahidian, se vor rezerva 5—6 ml lichid pentru cercetarea prezenţei leptospirelor, care se efectuează ca şi pentru sînge.

Leptospirele izolate prin culturi sau prin inoculare la animal sînt identificate cu ajutorul reacţiei de aglutinare-liză folosind seruri antileptospirotice cunoscute. Serurile se folosesc la început într-o diluţie de tatonare de 1/50 şi ulterior se continuă numai cu serurile pozitive. Identitatea tulpinii de cercetat este stabilită de serul care aglutinează la titrul cel mai înalt.

Pentru identificarea tulpinii de cercetat este necesar să folosim minimum 12 seruri antileptospirotice de diagnostic.

Sub influenţa aglutininelor specifice din serul imun cunoscut, leptospirele se unesc printr-una din extremităţi, cealaltă extremitate rămînînd liberă şi mobilă, dînd o imagine asemănătoare cu un păianjen. Fenomenul de liză care succede aglutinării se manifestă prin îngroşarea neregulată a leptospirelor, care se imobilizează complet, iar ulterior se rup în fragmente mici granulare.

Datorită faptului că izolările leptospirelor prin culturi şi inoculări necesită timp îndelungat şi adeseori izolarea tulpinii de leptospiră de la bolnav reuşeşte, după ce bolnavul s-a vindecat, în practica diagnosticului de laborator se utilizează curent decelarea prezenţei anticorpilor specifici. Examenele serologice dau excepţional rezultate pozitive înaintea celei de-a 5-a zi de boală, dar după a 6-a — a 7-a zi în peste 50% din cazuri se pot decela anticorpii.

Mijlocul cel mai precoce de diagnostic de laborator sînt reacţiile serologice, care sînt reprezentate de reacţia de aglutinare-liză şi reacţia de fixare a complementului.

Reacţia cea mai utilizată pînă în prezent este reacţia de aglutinare-liză care permite stabilirea tipului de leptospiră care a produs boala, dar are dezavantajul că este laborioasă ca execuţie şi necesită întreţinerea a minimum

12 tipuri serologice de leptospire, ceea ce nu este accesibil decît laboratoarelor de specialitate.

Reacția de fixare a complementului, foarte sensibilă și precoce, era puțin folosită în practică, datorită dificultății de preparare a antigenelor.

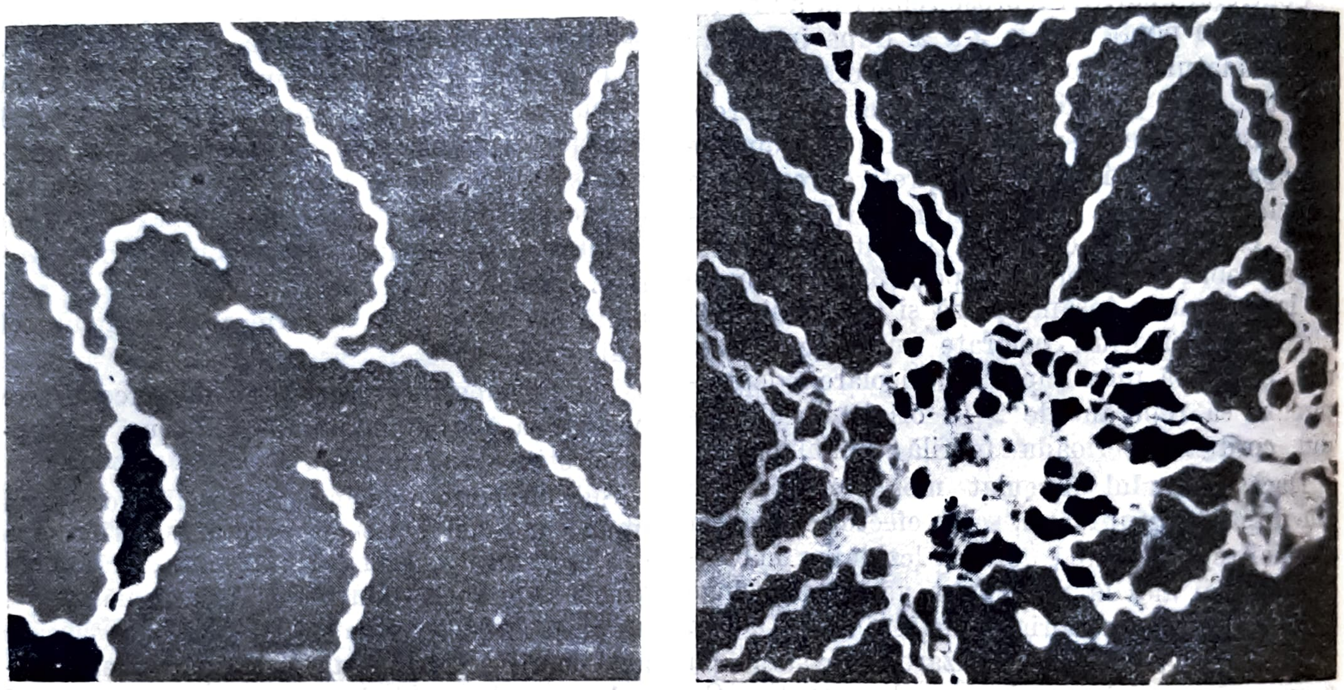


Fig. 346. — Reacţia de aglutinare-liză a leptospirelor. *A* — Cultură de *Leptospira icterohemorrhagiae* + ser de cercetat = reacție negativă. *B* — Cultură de *Leptospira icterohemorrhagiae* + ser imun = reacție pozitivă. (Imagine electronică × 13 000, colecția dr. A. Petrovici. Laboratorul de microscopie electronică. Institutul „Dr. I. Cantacuzino").

În cercetările întreprinse în anul 1960, dr. Nina Sturdza și colab., din Laboratorul de leptospiroze al Institutului „Dr. I. Cantacuzino" au reușit că prepare un antigen unic heterolog dintr-o tulpină saprofită de *Leptospira biflexa Patoc*, pentru reacția de fixare a complementului, care are o valoare polivalentă și dă reacții pozitive cu toate serurile provenite de la bolnavii de leptospiroză. Astfel reacția a devenit accesibilă tuturor laboratoarelor de clinică sau de igienă.

Experimentările de verificare a antigenului, efectuate de organele de specialitate ale O.M.S.-ului, în 1961, au confirmat valoarea practică a acestui antigen.

Antigenul *Leptospira biflexa Patoc* este un antigen mertiolat conservabil la 4°, minimum 6 luni de zile. El îngăduie depistarea cazurilor umane de leptospiroză, fără determinarea tipului etiologic, rămînînd ca acesta să fie precizat prin reacția de aglutinare-liză, de către un laborator de specialitate.

Folosirea acestui antigen polivalent ușurează mult depistarea leptospirozelor umane și permite confirmarea rapidă a unui diagnostic clinic de leptospiroză.

În a doua săptămînă de boală, care reprezintă faza de eliminare a leptospirelor prin urină și de apariție a anticorpilor în sînge, se vor face următoarele examene :

1. Se recoltează în mod steril urină alcalinizată. Bolnavul va lua din ajun bicarbonat de sodiu. Urina este centrifugată timp de 3 ore la 3 000 turații/min. Din sediment se fac frotiuri și examene directe, însămînțări și inoculări.

2. Diagnosticul serologic se face prin reacția de aglutinare-liză și prin reacția de fixare a complementului.

Reacția de aglutinare-liză (*R.A.L.*)

În Laboratorul de leptospiroze al Institutului „Dr. I. Cantacuzino" se folosesc ca antigene în reacția de aglutinare-liză 12 serotipuri de leptospire, și anume :

L. icterohaemorrhagiae
L. canicola
L. grippotyphosa
L. sejroe
L. hebdomadis
L. pomona

L. hyos (tarassovi, mitis)
L. australis A.
L. autumnalis
L. bataviae
L. ballum
L. poi

Colecția de tulpini de leptospire se întreține prin treceri repetate, la 20—30 de zile, pe mediile Terskih sau Korthoff. Fiecare tulpină de leptospiră este însămînțată în cîte 6 tuburi cu mediu. Tulpinile pentru aglutinare se trec la 7 zile. Ca antigene se folosesc culturile vii de leptospire, în vîrstă de 6—12 zile, cu o densitate de 500—1 000 de elemente pe cîmp (obiectiv 20×, ocular 15×).

Înainte de a efectua R.A.L., antigenele sînt controlate la microscopul cu fond obscur, pentru omogenitate, aglutinare spontană și aglutinabilitate specifică cu serurile-test. Nu se folosesc decît tulpini omogene, fără aglutinare spontană și sensibile față de serul-tip specific.

Tehnica reacției de aglutinare-liză. Metoda rapidă de aglutinare pe lamă. Din serul bolnavului se face o diluție inițială de 1/50 în ser fiziologic. Din această diluție se depun pe 2—3 lame atîtea picături cîte tulpini de leptospire se folosesc în reacție.

În laboratorul de leptospiroze se folosesc 2 lame, cu numărul serului, I și II. Pe fiecare se depun cîte 6 picături mici din diluția 1/50, apoi, din tulpinile folosite în reacție, înșirate totdeauna în aceeași ordine, pe stelaj, se adaugă, cu o pipetă Pasteur efilată, peste fiecare picătură de ser cîte o picătură, pe cît posibil egală, de cultură. Se amestecă cu baghete mici de sticlă (schimbînd bagheta pentru fiecare picătură) și se examinează pe fond întunecat; după 20 de minute de repaus la temperatura camerei (lamele se mențin în atmosferă umedă sub capac Petri), la martor se pun pe două lame cîte o picătură din fiecare serotip utilizat cu o picătură egală de ser fiziologic.

La darea rezultatului se va ține seama că diluția serului este dublată prin adăugarea antigenului.

Aglutinarea se manifestă prin îngrămădirea leptospirelor în gheme strînse mici (aglutinare intensă, unde intervine și liza) sau gheme stelate cu aspect de păianjen, mobile, datorită extremităților libere ale leptospirelor. Liza începe prin umflarea, imobilizarea, ștergerea conturului, dînd un aspect granular leptospirelor, putînd să ducă la dezagregarea și chiar dispariția leptospirelor. Aceste două fenomene, liza și aglutinarea, pot apărea concomitent sau izolat. În diluții mici putem avea numai liză, în diluții mari, numai aglutinare (notarea lizei se face cu L). Notarea aglutinării se face în felul următor: se notează cu +++ aglutinarea intensă, fără leptospire libere în cîmp; cu ++ aglutinarea în care predomină ghemele de leptospire, dar sînt și leptospire libere, și cu + cînd sînt cîteva gheme pe cîmp și predomină leptospirele libere.

Dacă serul este pozitiv, se continuă diluțiile de ser pînă la titru numai pentru tulpinile aglutinate. Se fac diluții binare succesive în tub, trecînd din fiecare diluție cîte o picătură pe lamă, peste care se adaugă cîte o picătură din tulpina cu care a reacționat serul în diluția 1/50. Considerăm serul pozitiv dacă titrul aglutinant depășește 1/200.

Repetarea R.A.L. după 5—6 zile și constatarea creșterii titrului sînt indispensabile pentru confirmarea diagnosticului de boală recentă. Titrurile scăzute și staționare pot indica trecerea prin boală cu ani în urmă.

Pentru a preveni infecțiile de laborator este necesar să respectăm următoarele precauții: se va evita atingerea picăturilor cu mîna; lamele examinate și baghetele de sticlă cu care s-au amestecat picăturile sînt depuse într-un cristalizator cu soluție de acid sulfuric 20%; mesele de lucru vor fi dezinfectate cu soluții acide.

Reacția de fixare a complementului (*R.F.C.*)

Recomandată de Institutul „Dr. I. Cantacuzino", Laboratorul de leptospiroze, servește numai în diagnosticul leptospirozelor umane, fără a stabili serotipul care a cauzat îmbolnăvirea.

Antigenul utilizat este preparat cu o singură tulpină, care are valoare polivalentă.

Tehnica reacției este identică cu cea utilizată în R.F.C. pentru tifosul exantematic. Elementele care intră în reacție se utilizează fiecare în volum de 0,2 ml, astfel încît volumul lor total să fie de 1 ml pentru un tub de hemoliză.

Material necesar:

a) Serul de cercetat, recoltat steril, perfect limpede, fără hematii, inactivat 30 de minute la 56°.

b) Antigen *L. biflexa Patoc*; diluția de lucru indicată pe etichetă arată că în 0,2 ml din diluția respectivă se găsesc 4 u. antigenice.

c) Hemolizină titrată în mod special pentru utilizarea în această reacţie; în R.F.C. pentru diagnosticul leptospirozelor umane se va lucra cu aceeași hemolizină cu care se execută și R.F.C. în tifosul exantematic. Diluția de lucru indicată pe etichetă arată că în 0,2 ml din această diluţie se află 2 u. hemolitice.

d) Suspensie 2% din hematii de oaie, proaspăt spălate, readuse la volum iniţial.

e) Sistemul hemolitic preparat cu 10 minute înainte de a fi adăugat (0,2 ml hemolizină diluată, astfel încît 0,2 ml să conţină 2 u. hemolitice + 0,2 ml hematii 2%) și incubat 10 minute la 37°.

f) Alexină titrată în aceeași dimineață în prezența antigenului (pentru a stabili diluţia în care eventuala putere antecomplementară a acestuia nu se manifestă). Alexina este diluată astfel, încît 0,2 ml să conţină 2 u. alexice. Pentru titrarea alexinei și efectuarea R.F.C. se va utiliza același sistem hemolitic. Alexinei, proaspăt recoltate, i se adaugă soluţie saturată de clorură de sodiu, în proporţie de 1/10. Astfel pregătită, alexina se păstrează la frigider pînă în momentul utilizării. Pentru titrare, alexina conservată este diluată 1/40 (la 0,1 ml alexină se adaugă 0,3 ml apă distilată pentru izotonizare și 3,6 ml soluţie clorurosodică 8,5‰).

Titrul alexinei (o unitate de alexină) este reprezentat de cantitatea de alexină imediat următoare primului tub care prezintă o hemoliză completă. De exemplu, dacă al doilea tub care prezintă hemoliză completă conţine 0,18 ml alexină diluată 1/40, o unitate de alexină este reprezentată de 0,2 ml din această diluţie.

În R.F.C. pentru diagnosticul leptospirozelor umane se va lucra cu 2 u. alexină. Exemplu: dacă o unitate de alexină este egală cu 0,2 ml din diluţia 1/40, 2 u. sînt conţinute în 0,2 ml din diluţia 1/20. Pentru practicarea corectă a reacţiei este recomandabil ca cele 2 u. alexină să fie cuprinse totdeauna într-un volum de 0,2 ml. În acest scop se recomandă următoarea metodă de calculare a diluţiilor: fie o unitate de alexină la 0,18 ml din diluţia 1/40, fie, în reacţie, 40 de tuburi. În acest caz 2 u. alexină sînt cuprinse în 0,18 ml din diluţia 1/20 sau în 0,009 ml alexină brută, pentru fiecare tub de reacţie. Pentru a realiza izotonizarea, se adaugă o cantitate de trei ori mai mare de apă distilată (0,36 × 3 = 1,08 apă distilată) și se aduce la volumul de 8 ml (0,2 ml pe tub × 40 tuburi = 8 ml), prin adăugare de soluţie clorurosodică $8,5^0/_{00}$. Deci 0,36 ml alexină diluată, în așa fel încît să conţină 2 u. alexice/0,2 ml.

g) Ser pozitiv.

h) Ser sigur negativ (ser normal) inactivat 30 de minute la 56°.

i) soluţie clorurosodică $8,5^0/_{00}$ sterilă.

j) Pipete gradate, stelaje, tuburi 46/16, tuburi de hemoliză, termostat 37°, baie de apă și, eventual, frigider.

Martorii pentru serul de cercetat se fac pentru fiecare ser în parte. Ceilalţi martori se fac o singură dată pentru fiecare zi de lucru.

Citirea rezultatelor. Se notează intensitatea hemolizei, mărimea sedimentului de hematii și aspectul lichidului supernatant cu —, +, ++, +++, ++++, în felul următor:

R.F.C. negativă = hemoliză completă, cu absenţa sedimentului de hematii (—).

R.F.C. slab pozitivă = hemoliză aproape completă. Sediment de hematii foarte slab, lichid supernatant colorat roșu intens (+).

TABELUL 128

Schema titrării alexinei

Tubul nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Alexină diluată 1/4o (ml)	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Ser fiziologic (ml)	0,38	0,36	0,34	0,32	0,30	0,28	0,26	0,24	0,22	0,20
Antigen *L. biflexa Patoc* (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Se agită și se menține 1 oră la 37°										
Sistem hemolitic (ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Se agită și se menţine încă 1 oră la 37°										

TABELUL 129

Schema reacţiilor-martor pentru controlul elementelor utilizate în reacţie

	Martori-ser de cercetat				Martor ser sigur normal	Martor ser sigur pozitiv	Martori-antigen		Martori alexină			
	1	2	3	4			1	2	1	2	3	4
Ser de cercetat inactivat la 56° (ml) diluţie	1/4	1/8	1/16	1/32	—	—	—	—	—	—	—	—
volum	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—	—	—	—	—	—
Ser normal inactivat 30 de minute la 56°, diluţie 1/4 (ml)	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—	—
Ser sigur pozitiv inactivat şi diluat sub titru (ml)	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—
Antigen 4 u.	—	—	—	—	0,2	0,2	0,4	0,2	—	—	—	—
Alexină 2 u.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,05	0,10	0,15	0,20
Soluţie clorurosodică 8,5‰ (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—	0,2	0,55	0,50	0,45	0,40
Se agită tuburile şi se menţin 1 oră la 37°												
Sistem hemolitic (ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

R.F.C. dubios pozitivă = hemoliză parţială (50%). Sediment de hematii redus, cu lichidul supernatant colorat roşu (++).

Citirea provizorie se face după 1 oră la 37° şi cea definitivă, după 20 de ore, la 4° sau la temperatura camerei.

R.F.C. pozitivă = grad redus de hemoliză. Sediment compact de hematii, lichid supernatant slab colorat în roz (+++).

R.F.C. intens pozitivă = absenţa totală a hemolizei. Sediment compact de hematii, lichid supernatant incolor (++++).

Titrul fixator al serului cercetat este indicat de ultima diluţie care, după această notaţie, determină o R.F.C. pozitivă cu +++.

Interpretare : R.F.C. cu antigenul *L. biflexa Patoc* începe să fie pozitivă din a 5-a — a 7-a zi de boală, la un titru care creşte paralel cu evoluţia bolii, atingînd maximum în a treia săptămînă după debut. Titrul semnificativ se apreciază în funcţie de condiţiile epidemiologice locale. Reacţiile pozitive la titrul 1/8—1/16 pot fi socotite semnificative dacă titrul creşte în cursul a două examene succesive în timpul bolii. R.F.C. se negativează după 2 pînă la 6 luni de la debut, permiţînd astfel diagnosticul numai în cazurile recente de leptospiroză umană.

Serurile pozitive vor fi expediate Laboratorului de leptospiroze din Institutul „Dr. I. Cantacuzino" pentru stabilirea serotipului care a cauzat îmbolnăvirea, în vederea orientării anchetei epidemiologice.

Reacţiile de aglutinare-liză şi de fixare a complementului sînt net pozitive începînd cu a doua săptămînă de boală. Anticorpii aglutinanţi şi litici se menţin în titruri ridicate pînă la 6 luni după îmbolnăvire şi pot persista ani de zile. Spre deosebire de aceştia, anticorpii fixatori de complement dispar în medie după 3 luni şi nu-i găsim niciodată peste 6 luni după îmbolnăvire. Datorită acestei caracteristici, prin folosirea ambelor reacţii, putem să deosebim foşti bolnavi de cazurile recente de leptospiroze.

Desigur că pentru stabilirea corectă a unui diagnostic serologic este necesar să urmărim creşterea succesivă a titrului anticorpilor, prin repetarea reacţiilor serologice de diagnostic. Creşterea titrului anticorpilor de la o reacţie la alta poate fi interpretată ca un indice de elaborare activă de anticorpi în organismul bolnavului şi deci un semn sigur de infecţie recentă.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LEPTOSPIROZELOR

Schema de diagnostic

Recoltarea produsului patologic se face în concordanță cu stadiul de evoluție a infecției cu leptospire.

A. *În primul septenar de boală*

Leptospirele sînt prezente în sînge, iar după 5—6 zile de boală apar anticorpii fixatori de complement.

- Sînge recoltat steril prin puncție venoasă:
  1. Inocularea intraperitoneală a 4 ml sînge citratat la cobai tineri, sub 200 g.
  2. Însămînțări pe medii speciale: Uhlenhuth, Terskih sau Korthoff.
  3. Examen direct al unui frotiu de sînge colorat cu metoda Giemsa, prelungit.
  4. Examen direct al supernatantului din sîngele citratat, după depunerea hematiilor, între lamă și lamelă, la microscopul cu cîmp întunecat.
- Lichid cefalorahidian (în caz de simptome meningiene).
  1. Inocularea intraperitoneală a 4 ml lichid la cobai tineri sub 200 g.
  2. Însămînțări pe medii speciale: Uhlenhuth, Terskih sau Korthoff.
  3. Eventual examen direct după colorare cu metoda Giemsa, prelungit.
- Decelarea anticorpilor în serul bolnavului, se practică din a 5-a zi de boală, reacția de fixare a complementului cu antigen polivalent *Leptospira biflexa Patoc.*
- Leptospirele izolate din sînge sau lichid cefalorahidian prin inoculare la cobai sau prin însămînțări vor fi identificate prin reacția de aglutinare-liză cu cele 12 tulpini standard de leptospire.

B. *După prima săptămînă de boală*

- Urina recoltată steril după administrarea în prealabil a unui tratament alcalinizant bolnavului se centrifughează 10 minute la 3 000 ture /min. Din sediment se execută inoculări la cobai, însămînțări pe medii, frotiuri și examene directe la microscopul cu cîmp întunecat.
- Decelarea anticorpilor specifici în serul bolnavului:

  a) Prin reacția de fixare a complementului cu antigen polivalent din *Leptospira biflexa Patoc* care se repetă la cîteva zile interval, pentru a urmări creșterea dinamică a titrului. Serurile pozitive se trimit la laboratorul regional al Inspecției de stat pentru igienă și protecția muncii sau la Laboratorul de leptospiroze al Institutului „Dr. I. Cantacuzino" pentru identificarea tipului de anticorp cu ajutorul reacției de aglutinare-liză cu cele 12 tulpini standard de leptospire. În practica diagnosticului clinic, R.F.C. este suficientă pentru a confirma diagnosticul de leptospiroză.

  b) Prin reacția de aglutinare-liză cu ajutorul celor 12 tulpini standard de leptospire patogene pentru a stabili tipul de leptospiră care a cauzat infecția și a completa datele anchetei epidemiologice. Reacția de aglutinare-liză se va repeta la 5 zile interval, pentru a urmări dinamica titrului anticorpilor.

BIBLIOGRAFIE

AUSTONI M. — Le leptospirosi, Ed. Minerva Medica, Torino, 1953.

BABUDIERI B. — Laboratory diagnosis of Leptospirosis, *Bull. O.M.S.*, 1961, vol. 24, p. 45—58.

CALININ V. S., GHINSBURG S. I. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecțioase, Sinai G. I. și Birgher O.G., Ed. științ., București, 1952, p. 500—512.

CANNEFAX R. G., GARSON W. — Reiter Protein complement fixation test for syphilis, *Publ. Hlth. Rep.* (*Wash.*), 1957, vol. 72, p. 335—340.

COMBIESCU D., STURDZA NINA — Actualități și perspective în domeniul leptospirozelor, Zoonoze, Ed. med. S.S.M., București, 1960, p. 87.

COVERT V. C., KENT F. J., STEVENS W. R. — Treponemal antibody test using the fluorescent Reiter Treponema, *Proc. Soc. exp. Biol.* (*N. Y.*), 1961, vol. 106, p. 326—330.

CZELL O. — Leptospirosen Klinik und Epidemiologie von Weilscher Krankheit, Ed. Hans Hübner, Berna, 1952.

D'ALESSANDRO D. — On the nature of Wassermann's Reaction, *Panminerva med.* (*Torino*), 1957, vol. 2, p. 123—125.

DEACON E. W., FALCONE V. H., HARRIS A. — A fluorescent test for Treponema antibodies, *Proc. Soc. exp. Biol.* (*N. Y.*), 1957, vol. 75, p. 232—234.

EAGLE H. — Bacterial and Mycotic Infections of Man, R. Dubos, Ediția a 2-a, Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 572—601.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 235—259 și 895—953.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 352—373.

HENNING S., WEISS BENTZON M. — Investigations on the rapid plasma reagin test, *Bull. O.M.S.*, 1958, vol. 19, p. 563—568.

KIKTENKO V. — Leptospirozele omului, Medghiz, Moscova, 1955.

KOLMER A. J., BOERNER F. — Approwed Laboratory Techniques, Ediția a 4-a, Ed. Appleton-Century, New-York, 1945, p. 485.

MAGNUSON J. H., PORTNOY J. — The Treponema pallidum complement fixation test, *Amer. J. publ. Hlth.*, 1956, vol. 46, p. 190—194.

MACKIE T. J., MC CARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 538—559.

MC LEOD CHARLOTTE, MAGNUSON J. H. — Aglutination of Treponema pallidum in syphilis serums, *Publ. Hlth. Rep. Wash.*, 1953, vol. 68, p. 747—755.

NICOLAU G., DĂNILĂ P. — Serologia sifilisului, Ed. medicală, București, 1958.

NIELSEN A. H., REYN ALICE — The Treponema pallidum immobilisation test, *Bull. O.M.S.*, 1956, vol. 14, p. 263—288.

PORTNOY J., GARSON W. — Rapid Plasma Reagin Test for Syphilis, *Publ. Hlth Rep.* (*Wash.*), 1957, vol. 72, p. 761—766.

* * * — Série de Rapports Techniques,Nr. 190. Comité d'experts des maladies véneriennes et des Tréponématoses (cinquième rapport), O.M.S., Genève, 1960, p. 64—67 (Sérologie et techniques de laboratoire en matière de Tréponématoses).

POPOV P. P. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecțioase G. J. Sinai și O. G. Birgher), ed. științ., București, 1952, p. 496—500.

PORTNOY J., MAGNUSON J. H. — Treponema pallidum complement — fixation (TPCF) test for syphilis. *Amer. J. clin. Path.*, 1956, vol. 26, p. 313—322.

RIMPAU W. — Die Leptospirosen, Ed. Urban, Berlin, 1950.

ROVELLE A. N., TONKS D. B. — Pure phosphatidis and the serodiagnosis of syphilis : relation of chemical structure to reactivity, *Bull. O.M.S.*, 1958, vol. 19, p. 547—562.

SEFER M. — Bacteriologie medicală, (sub. redacția prof. N. Nestorescu și colab.), Ed. medicală, București, 1961, 703—736.

SINAI G. J. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecțioase, G. J. Sinai și O. G. Birgher), Ed. științ., București, 1952, p. 457—459.

STURDZA NINA, TULPAN GERTRUDE — Diagnosis of Human Leptospirosis by the complement fixation test with a simple antigen, *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 1960, vol. 19, p. 571—582.

STURDZA NINA — Diagnosticul de laborator al leptospirozelor, *Microbiologia* (*București*), 1961, nr. 2, p. 161—176.

STURDZA NINA, SEFER M., RADU I. — Diagnosticul de laborator în leptospiroze, Zoonoze, Ed. S. S. M., București, 1960, p. 99.

THEIL, VAN — The Leptospirosen, Ed. Leyde, Amsterdam, 1948.

THOMPSON R. V. — Microbiology and Epidemiology, Ediția a 4-a, Ed. Saunders, Londra, 1958, p. 437—445.

TOPLEY AND WILSON'S — Principles of Bacteriology and Immunity, Ediția a 4-a, Ed. Edward Arnold, Londra, 1955, vol. 1, p. 1 031—1 052 ; vol. 2, p. 2 021—2 054.

VAISMAN A., HAMELIN A. — Valeur de la réaction de fixation du complément avec l'antigène Treponema pallidum ultrasonée pour le sérodiagnostic de la syphilis, *Bull. O.M.S.*, 1961, vol. 24, nr. 2, p. 239—248.

WILCOX R. R. — Perspectives in venerology, *Bull. Hyg. (Lond.)*, 1961, vol. 36, nr. 9, p. 825—837.

WOLFF J. W. — Zoonoses, O.M.S., Genève,.1954.

WHITBY, HYNES M. — Medical Bacteriology, Ediția a 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 326—348.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, vol. 2, p. 632—685.

ZINSSER H. — Textbook of bacteriology, Ediția a 11-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New-York, 1957, p. 521—555.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIEI CĂRBUNOASE

Familia : *Bacilaceae*. Genul : *Bacillus*. Specia tip : *Bacillus anthracis*.

Generalități

Bacil de 4—8μ lungime și 1—1,5 μ grosime, descoperiți de Davaine, în 1864; au capetele tăiate drept, dispuse de obicei în lanțuri, rareori în diplo sau izolat, sînt capsulați în organism și pe medii cu substanțe organice complexe, sporulat, imobil, aerob și anaerob facultativ, Gram-pozitiv, determinînd, la om și animalele sensibile, infecția cărbunoasă sau dalacul.

Habitat

În natură poate fi întîlnit pe sol și vegetație sub formă de spori și în cadavrele animalelor moarte de cărbune sau dalac. Infecția cărbunoasă este o zoonoză; ea se transmite accidental la om, prin contactul cu animalele bolnave sau cu produsele lor: piele, carne, păr, lînă etc., unde bacilii cărbunelui se mențin viabili ani de zile, sub forma de spori.

Rezistența

Extrem de rezistenți sub forma sporulată. Temperatura de 55—60° omoară în 10—15 minute formele vegetative. Căldura umedă sub presiune, în autoclav, omoară sporii în 12—50 de minute. Căldura uscată la 140° distruge sporii abia în 4—5 ore. Antisepticele în concentrații obișnuite omoară rapid formele vegetative și foarte încet sporii. NaOH soluție 5% distruge cel mai repede sporii. Sublimatul 1/1 000 distruge sporii în 5—10 minute. Clorura de var în soluție 5% îi omoară în 5 minute. În cadavrele de animale nedeschise, bacteriile nu

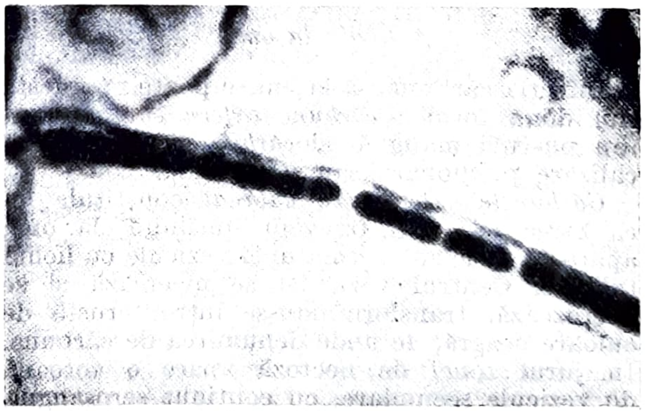


Fig. 347. — *Bacillus anthracis*. Frotiu din splină de șoarece infectat experimental. Se vede capsula (colorație albastră Manson).

sporulează și mor în scurt timp. În cadavrele deschise, sporulația se produce repede dacă temperatura depășește +4°. Este sensibil la chimioterapice și antibiotice. Dintre sulfamide, bacilul este mai sensibil la acțiunea sulfadiazinei, sulfatiazolului și sulfapiridinei.

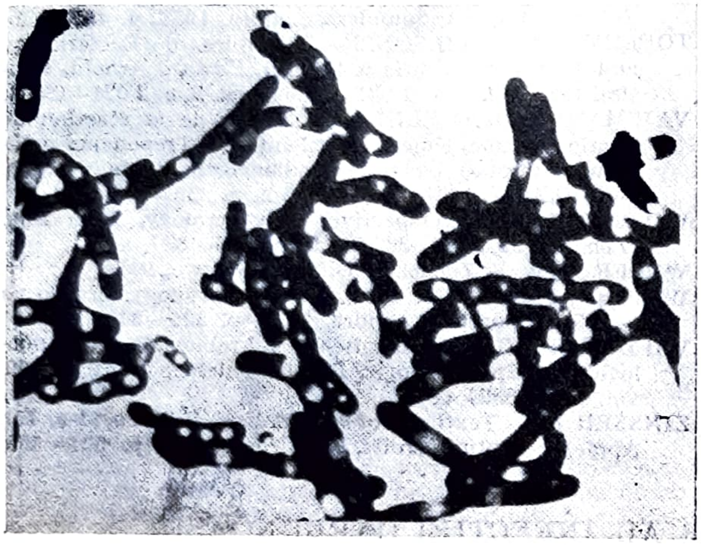


Fig. 348. — Bacillus anthracis. Frotiu dintr-o cultură sporulată. Se vede imaginea negativă a sporului situat central (colorație Gram).

Dintre antibiotice, streptomicina și penicilina sînt deosebit de active, atît în infecția la om, cît și la animale.

Boala la om

Infecția cărbunoasă la om se poate manifesta sub două forme: *cărbune extern* sau cutanat sau pustulă malignă și *cărbune intern*, cu localizare pulmonară sau intestinală.

Cărbunele extern sau cutanat constituie localizarea cea mai frecvent întîlnită la om; apare pe piele sub forma unei vezicule cu lichid tulbure. Centrul veziculei se ulcerează și se necrozează, transformîndu-se într-o crustă de culoare neagră, de unde denumirea de cărbune. În jurul zonei de necroză apare o coroană de vezicule secundare, cu conținut serosanguinolent sau purulent. Țesuturile învecinate sînt edemațiate, edemul putînd lua uneori proporții considerabile. Din leziunea locală bacilii pot pătrunde în sînge, dînd septicemii deosebit de grave.

Cărbunele intern cu localizare pulmonară, însoțit de fenomene pneumonice urmate de septicemie, apare la muncitorii dărăcitori de lînă sau în tăbăcăriile improvizate, unde se lucrează în atmosferă de praf încărcat cu spori de *B. anthracis.*

Cărbunele intern cu localizare intestinală se manifestă prin fenomene de gastroenterită acută, cu scaune hemoragice, urmate de septicemie și survine la indivizii care consumă carnea animalelor infectate.

Diagnosticul bacteriologic

Se poate face pe viu, la omul bolnav sau retrospectiv, pe cadavrul uman sau animal.

Diagnosticul bacteriologic *în forma cutanată* se realizează prin efectuarea unui frotiu din serozitatea recoltată cu pipeta Pasteur din veziculă. Frotiul se fixează la flacără și se colorează Gram. Cînd bacilii cărbunelui sînt prezenți, vom vedea la microscop bacili mari, lungi, cu capetele tăiate drept, izolați și în lanțuri scurte. În jurul fiecărui bacil se observă o zonă clară, care reprezintă capsula. Capsula poate fi colorată numai cu metode speciale. În cazurile dubioase și acolo unde întîlnim foarte puțini bacili în frotiu, se continuă diagnosticul prin însămînțări pe mediile de cultură. Bacilul cărbunelui, fiind un germen aerob, crește pe toate mediile uzuale.

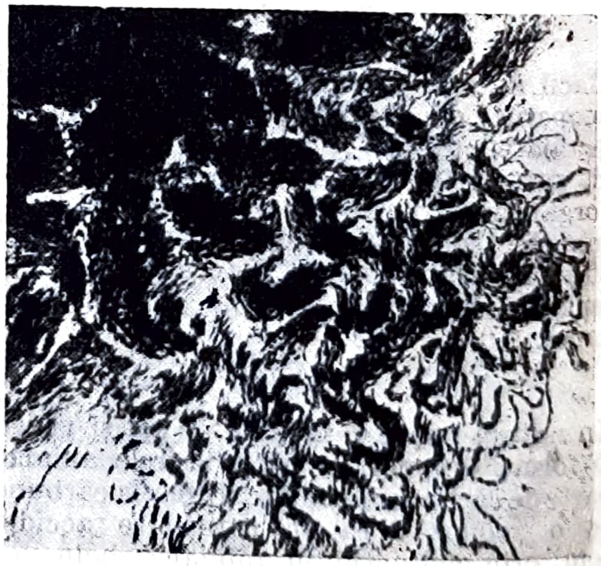


Fig. 349. — Bacillus anthracis. Aspectul „cap de meduză" al unei colonii pe geloză.

Pe geloză înclinată apar, după 24 de ore de incubație la 37°, colonii caracteristice, uscate, gălbui, cu marginile dantelate, care emit filamente subțiri, vizibile cu lupa, dînd aspectul unei bucle de păr sau al unui cap de meduză, colonii R. Pe bulion simplu se formează flocoane albe; între ele bulionul rămîne clar. Flocoanele cad la fund și formează un sediment albicios. Pe gelatină însămînțată prin înțepare crește sub forma unui brad inversat, lichefiind mediul la partea superioară.

Frotiurile din cultură ne arată bacilii dispuși în lanțuri lungi, caracteristice. Colorația specială pentru spori pune în evidență, în culturile aerobe, un corpuscul ovalar situat în mijlocul corpului bacterian, prezentînd în stare proaspătă o refringență deosebită, care îl face vizibil. Bacilul cărbunelui este proteolitic și pentru a-i studia aceste proprietăți se însămînțează din cultură, pe plăci de gelatină. După 24 de ore apar colonii de culoare albicioasă, cu marginile neregulate, ca acele de gheață. După 2—3 zile iau aspect de filamente încîlcite, apoi gelatina începe să se lichefieze. Pe ser coagulat apar colonii albicioase, care lichefiază mediul. Pe medii cu lapte crește bine și după 2—3 zile coagulează laptele.

Diagnosticul bacteriologic în *cărbunele intern* se realizează prin recoltarea produselor patologice reprezentate de spută sau materii fecale, din care se fac frotiuri; se încălzește produsul patologic 10—30 de minute la 80°, pentru eliminarea florei de asociație nesporulate, apoi se fac izolări pe medii solide, studiindu-se caracterele morfologice tinctoriale și de cultură, plecînd de la o colonie izolată.

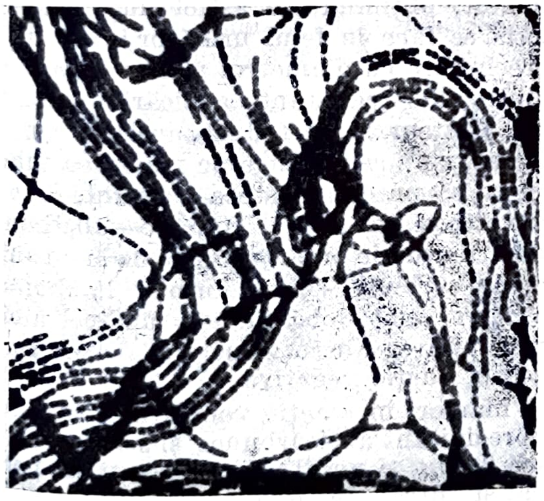


Fig. 350. — *Bacillus anthracis.* Frotiu dintr-o cultură în bulion. Aspect caracteristic de streptobacil (colorație Gram).

Pentru diagnosticul de laborator al cărbunelui sînt suficiente de obicei examenul microscopic, caracterele de cultură și infecția experimentală pe șoarece prin inoculare intraperitoneală a 0,5 ml cultură în bulion. Șoarecele face o septicemie mortală în 24—48 de ore. La autopsia animalelor se reizolează bacilul în cultură pură prin tehnica hemoculturii din cord și se execută frotiuri prin amprentă din splină. Bacilii antraxului sînt foarte numeroși la marginea frotiului, au morfologia caracteristică și prezintă capsulă. În cazurile cu septicemie se practică totdeauna hemocultura în bulion, după tehnica obișnuită.

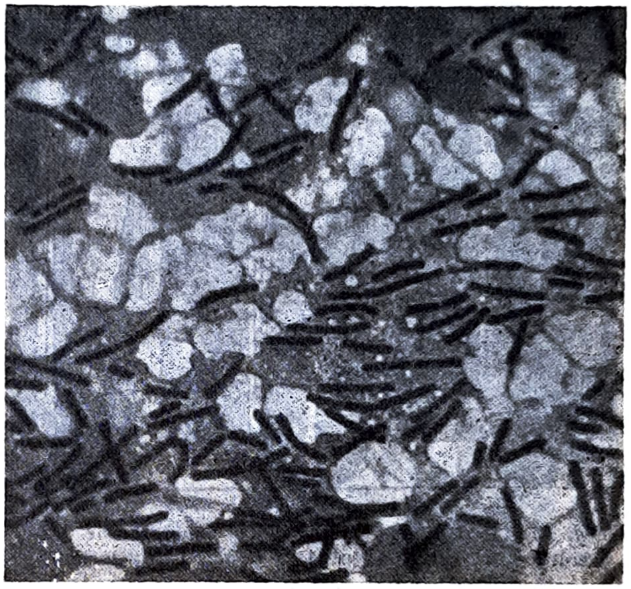


Fig. 351. — Septicemie experimentală cu *Bacillus anthracis* la șoarece; amprentă din splină (colorație Gram) (colecția autorului).

În formele clinice la care se pune problema diferențierii de bacterii sporulate aerobe saprofite, așa-numiții bacili antracoizi, se completează diagnosticul prin inocularea subcutanată la șoarece, pentru evidențierea formării capsulei, și cu testul patogenității pentru cobai, prin inocularea unei culturi pure sau chiar a produsului patologic pe cale subcutanată, la cobai. Bacilii antracoizi, ca *B. subtilis*, *B. megatherium*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. circulans* etc., nu sînt niciodată patogeni pentru şoarece şi cobai pe cale subcutanată. După 15 ore de la inocularea subcutanată la cobai a culturii sau produsului patologic apare un edem gelatinos, sanguinolent care se întinde; ganglionii regionali se umflă, apar dispnee, febră şi moartea animalului survine după 24—48 de ore, prin septicemie. La animal nu se observă niciodată pustulă malignă, aşa cum evoluează infecţia cutanată la om. La necropsie, în afara reacţiei la locul de inoculare, se mai constată mărirea splinei. Se prelevă sînge din inimă şi fragmente din splină. Se fac însămînţări şi frotiuri prin amprentă, care se colorează cu Gram şi cu albastru de metilen.

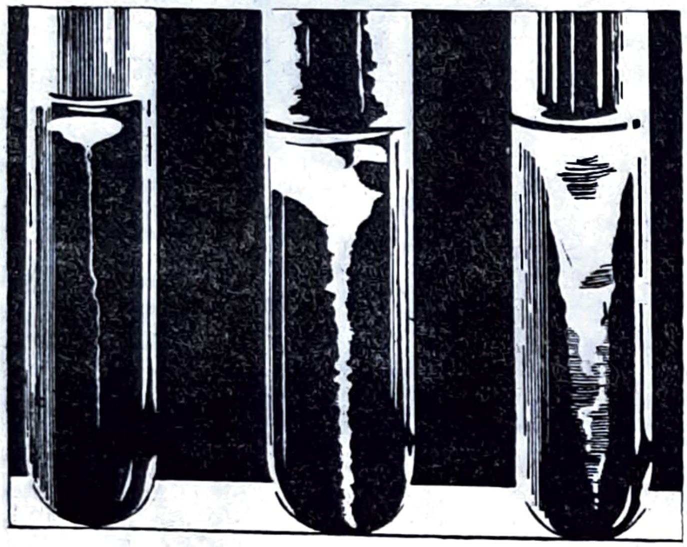


Fig. 352. — *Bacillus anthracis.* Faze succesive de dezvoltare în gelatină, pînă la lichefierea gelatinei.

Diagnosticul retrospectiv se adresează animalelor moarte cu semne suspecte de infecţie cărbunoasă. Prelevarea viscerelor şi a sîngelui se face cît mai repede după moartea animalului. La cadavre care sînt într-un stadiu avansat de putrefacţie, bacteridia poate dispărea, din sînge şi viscere, dar poate fi găsită în măduva osoasă, care se aspiră cu o pipetă sterilă şi se însămînţează. Tot la cadavru se face *reacţia termoprecipitinelor Ascoli*.

Această reacţie se bazează pe faptul că serul anticărbunos provoacă un precipitat specific în contact cu extractele de organe provenite de la animalele moarte de infecţie cărbunoasă.

Elementele reacţiei:

a) ser precipitant anticărbunos cu un titru ridicat;

b) ser normal de cal;

c) antigenul (filtrat de organe);

d) soluţie clorurosodică 8,5$^0/_{00}$.

Reacţia Ascoli se bazează pe faptul că antigenul se păstrează mult timp în materialele intrate chiar în putrefacţie. Chimic, acesta este un carbohidrat, o fracţiune antigenică termostabilă a corpului bacilar, făcînd parte din clasa haptenelor sau antigenelor parţiale.

Tehnica reacţiei. Prepararea antigenului: se iau fragmente de organe, în special splină, uneori chiar piele sau măduvă osoasă, care se triturează într-un mojar cu soluţie clorurosodică 8,5$^0/_{00}$ sterilă, în proporţie de 1/5. Se adaugă 2—3 picături de acid acetic şi se fierbe apoi la baie de apă timp de 5—10 minute, cu scopul de a coagula toate albuminele. Prin fierbere, antigenul solubil cărbunos nu este distrus, fiind termostabil.

Se decantează lichidul şi se alcalinizează cu 2—3 picături de hidroxid de sodiu, după care se filtrează prin hîrtie de filtru sau rondelă de azbest, obţinîndu-se astfel un lichid clar. Reacţia se face în felul următor: într-un tub de precipitare cu diametrul mic se repartizează 0,5 ml ser precipitant anticărbunos. Cu o pipetă Pasteur se introduce aceeaşi cantitate de filtrat, care se prelinge pe marginea tubului, astfel ca să nu se amestece cu serul. Se aşază apoi vertical în stelaj. După 5—10 minute, dacă extractul de organ provine de la un animal mort de cărbune, se va forma, la limita de separaţie a celor două lichide, un inel albicios de precipitare. Absenţa inelului de precipitare indică o reacţie negativă.

Ca martori în reacţie vom utiliza un tub cu ser precipitant anticărbunos şi soluţie clorurosodică 8,5$^0/_{00}$ şi un al doilea tub cu ser normal de cal şi filtrat de organ.

Datorită faptului că reacţia de precipitare Ascoli este foarte sensibilă, adeseori reprezintă singura modalitate de a decela prezenţa antigenului cărbunos într-un produs în care examenul bacteriologic a dat rezultate negative. Rezultatele pozitive se obţin şi cu ţesuturi şi organe intrate în putrefacţie, de asemenea cu blănuri animale şi lînă infectată.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ANTRAXULUI

Schema de diagnostic

Produs patologic cu floră monomicrobiană

- Examen microscopic direct
- Frotiu din produs colorat Gram
- Eventual și colorația capsulei
- Însămînțări în bulion și geloză înclinată
- Examenul macroscopic și prin frotiu al culturilor pentru puritate
- Inocularea culturii pure, intraperitoneal, 0,5 ml, la șoarece sau subcutanat, la cobai, în caz de dubiu asupra purității culturii
- Izolarea prin hemocultură din cord a *B. Anthracis*
- Efectuarea de frotiuri prin amprentă din splină, colorație Gram și albastru de metilen, eventual colorație specială pentru capsulă

Produs patologic cuprinzînd floră variată

- Examen microscopic direct de orientare prin frotiu colorat Gram
- Însămînțare pe geloză în placă Petri și bulion

Fragmente de țesuturi de la cadavru

- Prepararea antigenului pentru Ascoli
- Reacția de precipitare Ascoli

Treceri și frotiuri din coloniile caracteristice "în cap de meduză" izolate pe geloză

gelatină prin înțepare

Frotiu colorat Gram streptobacili în lanțuri lungi

Bulion pentru cultură pură

Testarea sensibilității la antibiotice și chimioterapice

Pe agar 3% pentru formarea sporilor

Frotiu pentru colorația sporilor Pooman

Se eliberează buletinul de analiză, descriind caracteristicile morfologice, de cultură, de patogenitate și sensibilitatea la antibiotice.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIEI MORVOASE

Familia : *Parvobacteriaceae*. Genul : *Malleomyces*, Specia tip : ***Malleomyces mallei.***

Generalități

Agentul patogen al morvei, boală infecțioasă a solipedelor, care poate fi transmisă ocazional la om și la animale domestice, este *Malleomyces mallei*.

Animalele cele mai sensibile la această zoonoză sînt solipedele — catîrul, calul, măgarul — care fac forme acute și cronice, cu leziuni ale mucoasei nazale, leziuni pulmonare, ulcerații cutanate, abcese ganglionare. Boala este extrem de contagioasă și, transmisă la om, este aproape totdeauna mortală. Omul se contaminează prin contactul cu animalele bolnave. Microbul este întîlnit în produsele patologice și în leziunile animalelor bolnave.

Diagnosticul bacteriologic

Se realizează prin folosirea unor metode diferite, după cum este vorba de forme acute sau cronice.

În formele acute se face diagnosticul microbului prin izolare din produse patologice, ca secreție nazală, puroi, ulcerații sau pustulă.

La examenul direct pe frotiuri colorate cu Gram și cu albastru de toluidină se va vedea : un bacil mic imobil, neincapsulat, nesporulat, cu capetele rotunde, pleomorf, ușor încurbat, în navetă sau sub forme filamentoase și ramificate în culturi vechi. Este Gram-negativ, cu colorație bipolară, care se evidențiază bine prin colorarea cu albastru de toluidină sau tionină fenicată.

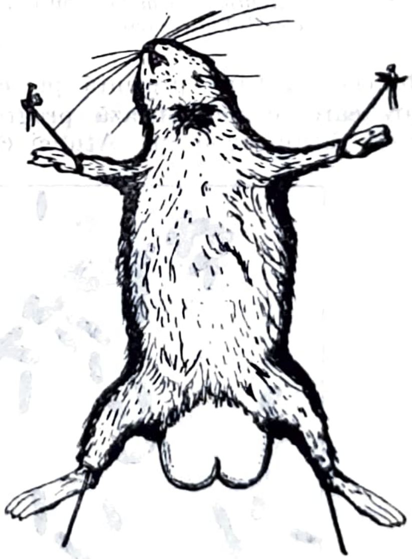


Fig. 353. — Orhită experimentală morvoasă la cobai.

Însămînțarea se face pe medii glicerinate. Pe geloză și cartof glicerinat se dezvoltă în 24—48 de ore, dînd colonii rotunde, strălucitoare, alunecoase, care prezintă pe cartof o pigmentare care se accentuează progresiv, de la galben la brun-șocolatiu. Atunci cînd microbul a putut fi izolat prin însămînțarea pe medii adecvate, se procedează la inoculare la animalul de elecție, care este cobaiul mascul. Acesta, infectat intraperitoneal, va face în 3—4 zile o orhită cu vaginalită; în puroiul extras se poate găsi bacilul morvei. Leziunea inflamatorie de orhită cu vaginalită, descrisă de Strauss, deși foarte caracteristică, nu este totuși patognomonică pentru morvă, putîndu-se reproduce și cu bacilii brucelozei. În formele cronice, diagnosticul se face fie direct, prin punerea în evidență a microbului în secrețiile patologice, fie prin izolarea lui prin hemocultură. Diagnosticul indirect se realizează prin evidențierea stării de alergie a organismului cu ajutorul reacției la maleină. Reacția la maleină poate fi executată pe cale subcutanată, intradermică, sub formă de cutireacție sau mai ales ca oftalmoreacție. Reacția la maleină se face exclusiv la animale. Maleina, care conține endotoxina bacilului morvei, este un filtrat de cultură veche în bulion, concentrat 1/10 care, injectat subcutanat, intradermic sau subconjunctival, determină, în cîteva ore, apariția unor fenomene locale și generale la animalul infectat, ceea ce indică prezența alergiei morvoase. La animalul normal maleina nu produce nici o reacție. Se pot folosi, ca metode indirecte de diagnostic, reacții serologice de aglutinare sau de fixare a complementului.

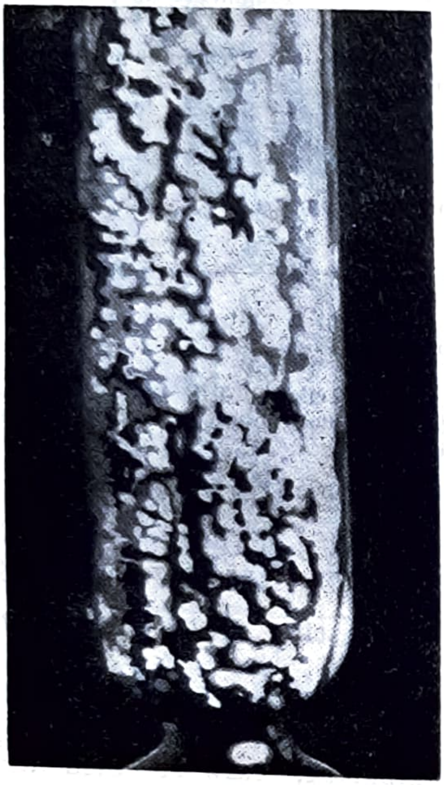


Fig. 354. — Malleomyces mallei. Cultură pe cartof glicerinat.

Pentru a evita contaminarea trebuie să cunoaștem rezistența microbului. Bacilul morvei este omorît în 10 minute la 55°, este sensibil la antiseptice (fenolul 2% îl distruge într-o

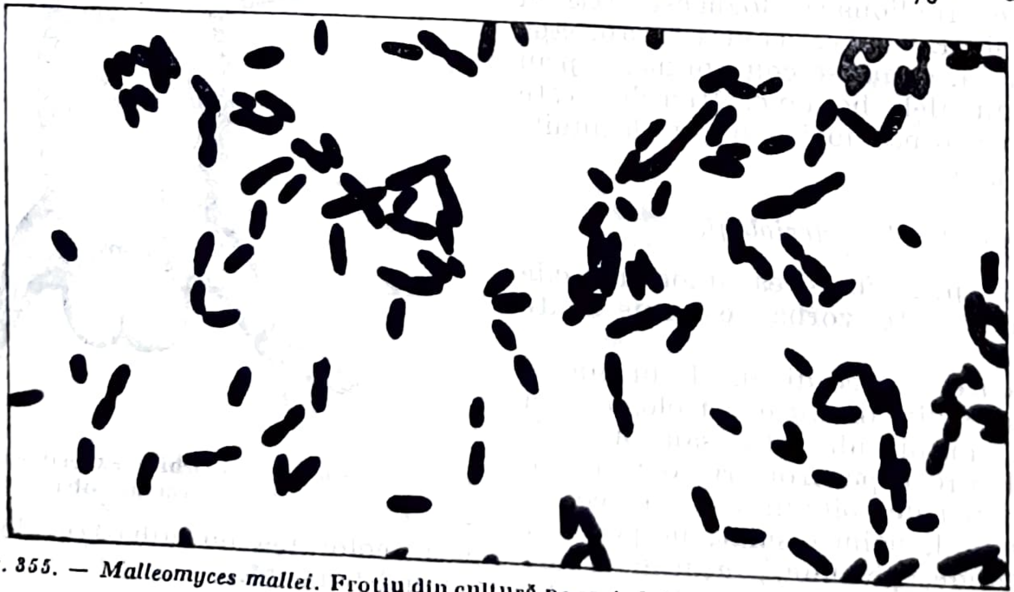


Fig. 355. — Malleomyces mallei. Frotiu din cultură pe cartof glicerinat (colorație Gram) (×3 000).

oră, sublimatul 1% în 15 minute). Rezistă timp de 4—6 săptămîni în culturi păstrate la gheţar.

Tratamentul cu sulfatiazol şi sulfadiazină dă rezultate inconstante în cazurile incipiente de boală. Antibioticele sînt fără efect.

Malleomyces pseudomallei este agentul cauzal al unei boli contagioase, melioidoza, întîlnită la rozătoare, mai ales la şobolani, transmisibilă la om. Melioidoza umană este o septicopioemie, a cărei formă supraacută se aseamănă cu holera sau pesta, forma acută amintind febra tifoidă. Forma cronică se manifestă prin apariţia de abcese subcutanate sau osoase. Este o boală frecventă mai ales în Extremul Orient; în ţara noastră poate fi întîlnită excepţional.

Schema caracterelor diferenţiale între Malleomyces mallei şi Malleomyces pseudomallei

M. mallei	*M. pseudomallei*
— Gram-negativ. Coloraţie bipolară cu albastru de toluidină.	— Gram-negativ. Coloraţie bipolară cu albastru de toluidină
— Creştere pe geloză sub formă de membrană transparentă, de culoare albă-cenuşie cu luciu sidefiu	— Creştere pe geloză sub formă de membrană vălurită de culoare gălbuie
— Nu lichefiază gelatina	— Lichefiază gelatina crateriform
— Pe cartof glicerinat, colonii brune-ciocolatii	— Pe cartof glicerinat formează membrană abundentă de culoare gălbuie
— Patogen pentru cobai. Şobolanul refractar	— Patogen pentru şobolan şi cobai

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECŢIA MORVOASĂ

Schema de diagnostic

Produs patologic: **secreţie nazală, puroi, serozitate din ulceraţie sau pustulă.**

- Se execută un frotiu direct şi se colorează cu Gram şi albastru de toluidină.
- Inocularea produsului patologic din leziuni sau secreţie nazală, pe cale subcutanată, la 2 cobai masculi.
- Însămînţări din produsul patologic pe geloză şi cartof glicerinat.
- Se controlează coloniile pigmentate caracteristice prin frotiu colorat cu Gram şi albastru de toluidină. Prezenţa cocobacililor Gram-negativ cu coloraţie bipolară constituie un prim indiciu.
- Din coloniile caracteristice se face un inocul care se introduce pe cale intraperitoneală la 2 cobai masculi. Se urmăreşte apariţia fenomenului Strauss şi se decelează prin frotiuri prezenţa bacililor morvei în abcese şi ulceraţii.
- Se urmăreşte evoluţia infecţiei experimentale la cobaii inoculaţi pe cale subcutanată care fac în 3—4 zile o orhită cu vaginalită caracteristică. Din puroiul extras prin puncţie se fac frotiuri colorate cu Gram şi albastru de toluidină.
- Excepţional se poate face diagnosticul diferenţial cu meloidoza, prin caracterele de creştere, biochimice şi de patogenitate, pe şobolan.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU BACTERII DIN GENUL *PASTEURELLA*

Familia: *Parvobacteriaceae*. Genul: *Pasteurella*. Specia tip: *Pasteurella pestis*.

Generalităţi.

Genul *Pasteurella* cuprinde bacterii de formă cocobacilară, de dimensiuni mici, pleomorfe, imobile, fără spori, cu sau fără capsulă, Gram-negative. Se colorează uşor cu culori de anilină; unele dintre ele apar mai intens colorate la capete, aspect denumit coloraţie bipolară. Speciile importante pentru patologia umană sînt ***Pasteurella pestis*** şi ***Pasteurella tularensis***, care provoacă la om ciuma sau pesta şi tularemia.

PASTEURELLA PESTIS

Agentul etiologic al pestei a fost descoperit în 1884 de Yersin, la Hong-Kong. Este un microb de dimensiuni mici (1—2 μ), de formă cocobacilară, care se colorează bipolar şi este imobil şi Gram-negativ. În culturile tinere prezintă capsulă, care apoi dispare, nu are spori. Cocobacilul pestei manifestă un accentuat pleomorfism în culturi. Pe mediile solide este la început de formă cocobacilară; apoi, pe măsură ce cultura se învecheşte, apar forme de involuţie în rachetă, măciucă, filamente şi forme rotunjite sferice. În mediile lichide se dezvoltă sub formă streptobacilară. Coloraţia bipolară se evidenţiază cel mai bine cu tionină fenicată.

Microbul creşte pe toate mediile de cultură între 5 şi 43°, cu zonă optimă de creştere între 25 şi 37°. Este aerob şi anaerob facultativ, are pH optim de dezvoltare în jurul neutralităţii. Adeseori, la izolare din produsele pato-

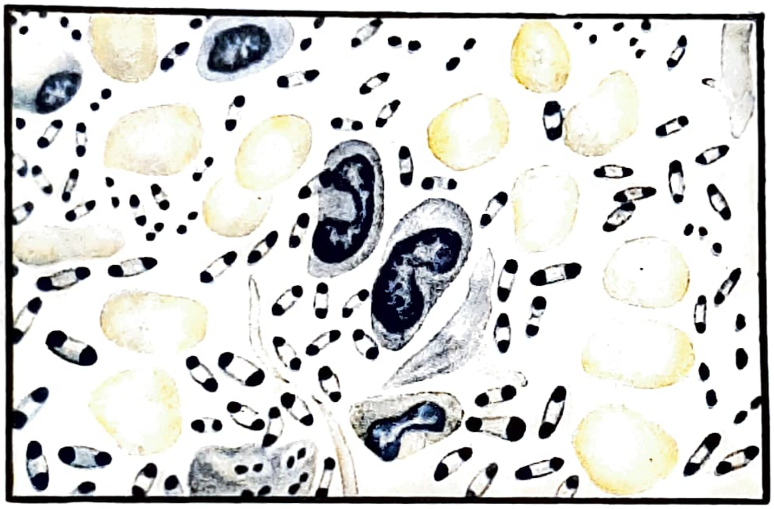


Fig. 356. — Pasteurella pestis. Frotiu dintr-un bubon pestos. Colorație bipolară cu tionină (adaptare după Kolle și Hetsch).

logice, bacilul pestei se dezvoltă mai rapid în culturile anaerobe. Forma normală, virulentă, a bacilului pestei este legată de tipul de colonie *R*. Coloniile S sînt avirulente. Dintre caracterele biochimice este important de reţinut că fermentează o serie de carbohidraţi, ca glucoza, levuloza, galactoza, maltoza şi manita. Nu fermentează lactoza, zaharoza şi ramnoza. Nefermentarea ramnozei permite diferenţierea lui de bacilul pseudotuberculozei rozătoarelor, cu care se aseamănă morfologic şi tinctorial. Pe geloza-sînge nu produce hemoliză. La adăpostul unui strat de ulei formolat sau ser formolat, bacilul îşi conservă virulenţa şi vitalitatea cîţiva ani de zile, păstrat la temperatura de 15—20°.

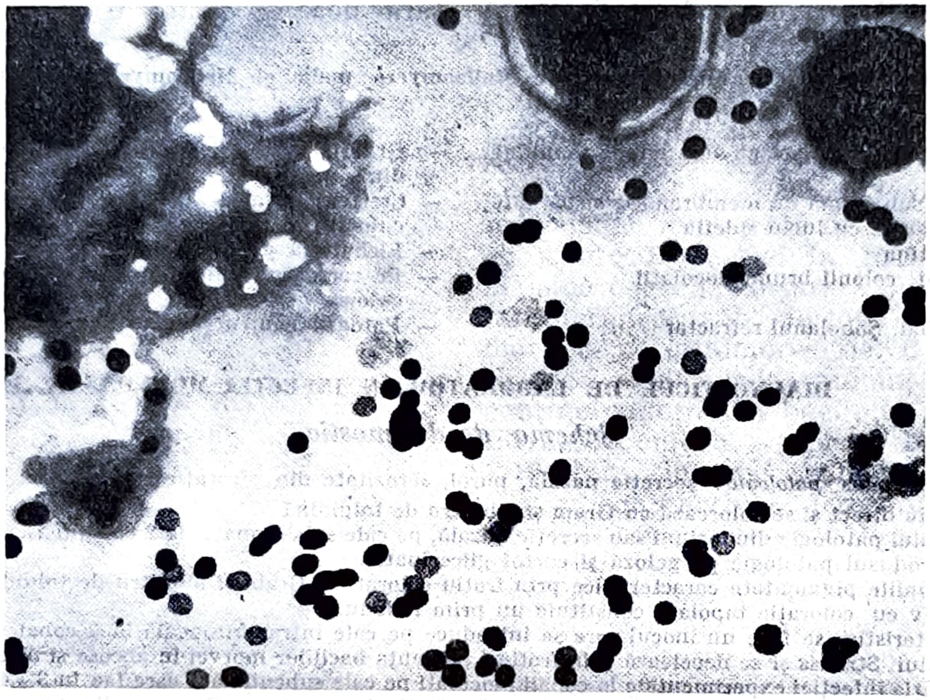


Fig. 357. — Pasteurella pestis. Frotiu din spută dintr-un caz de pestă pulmonară. Se observă numeroase forme de involuţie (adaptare după Kolle şi Hetsch).

Boala la om

Pasteurella pestis determină la om ciuma sau pesta, o boală infecţioasă extrem de contagioasă, comună omului şi rozătoarelor. Omul se contaminează cu pestă de la şobolani, prin intermediul unui vector, puricele şobolanului. Epizootia murină începe cu infectarea şobolanilor sălbatici *Mus decumanus*, care transmit apoi boala şobolanilor peridomestici *Mus rattus*, care constituie elementul contaminant pentru om.

Agentul vector, purecele şobolanului, *Xenopsilla cheopis*, pentru regiunile calde ale globului şi *Ceratofilus fasciatus*, pentru zonele temperate, introduce în organism, prin înţepătura pielii, o cantitate mare de bacili. Formele clinice umane sînt condiţionate de localizarea microbului; se întîlnesc 3 forme: pesta bubonică, pulmonară şi septicemică.

Pesta bubonică este consecutivă inoculării cutanate a bacilului prin înţepătura purecelui. La scurt timp după înţepătură apare adenopatia sau bubonul. Sediul bubonului este cel mai frecvent regiunea inghinală, dar poate fi întîlnit şi în axilă sau în regiunea maxilară. Bubonul este foarte dureros şi tinde la abcedare. Simptomele sînt variabile ca intensitate; cîteodată există forme atenuate, ambulatorii.

Pesta septicemică constituie complicaţia obişnuită a pestei bubonice. Bacilii se generalizează în organism pe cale sanguină, determinînd leziuni secundare embolice şi hemoragii în viscere şi organe.

Pesta pulmonară este o formă deosebit de contagioasă şi gravă. Se prezintă ca o pneumonie lobară bilaterală, datorită unei contaminări masive pe cale aeriană. Această formă are o evoluție supraacută, se însoțește de septicemie și determină o mortalitate foarte ridicată.

Diagnosticul de laborator

Recoltarea produselor patologice se face, în funcție de forma clinică, din serozitatea bubonului, din sînge și spută. De asemenea se recoltează sînge de la rozătoare vii sau de la cadavre de rozătoare și de la pureci.

Frotiurile realizate din produsele de cercetat se fixează cu un amestec de alcool-eter, apoi se dă foc amestecului și se colorează cu Gram sau, de preferință, cu tionină fenicată, pentru evidențierea colorației bipolare.

Însămînțarea produsului patologic se face pe medii obișnuite aerobe și anaerobe, geloză sau bulion. Microbul se dezvoltă încet; uneori necesită 5—7 zile pentru apariția coloniilor. În bulion crește sub formă de flocoane cu sediment bogat, cultură tip *R*. În bulionul anaerob crește sub forma unor stalactite, care pornesc de la suprafața bulionului. Pe geloză se dezvoltă în 3—4 zile colonii mici, proeminente, transparente, cu centrul opac, de aspect alb-cenușiu granular, colonii *R*.

Evidențierea caracterelor biochimice se face prin fermentarea glucozei, maltozei și ramnozei. Ramnoza nu e fermentată de bacilul pestei și servește la diagnosticul diferențial cu bacilul pseudotuberculozei rozătoarelor, în cazul în care izolarea s-a făcut de la șobolan. Caracterele de patogenitate se evidențiază prin realizarea infecției experimentale. Pentru aceasta se folosesc în special cobai, dar se pot utiliza și șoareci albi. Calea de inoculare a culturilor sau a produsului patologic poate fi variată: percutanată prin fricționarea pielii, în prealabil scarificată; intraperitoneală, cînd nu există floră de asociație în produs; subcutanată, pe suprafața internă a coapsei, cînd există floră de asociație în produse patologice.

După 2—5 zile animalul moare cu septicemie pestoasă. La examenul anatomopatologic al organelor găsim hemoragii și necroze în ganglioni și noduli necrotici în splină. Făcînd frotiuri și examinîndu-le la microscop găsim bacilul pestei în sînge, exsudate, ganglioni și organe. Pentru cercetări complementare serologice se folosește reacția de aglutinare cu serul anti-O și anticapsular. Datorită infecțiozității mari a pestei se cer precauții speciale de protecție în laboratoarele unde se lucrează cu material pestos.

Profilaxie

Vaccinarea preventivă cu vaccin antipestos, realizat cu tulpini atenuate de *Pasteurella pestis*. În ultimul timp s-au realizat vaccinuri cu tulpini avirulente, care, pe lîngă imunitatea specifică activă antipestoasă, conferă și un grad de securitate mai mare în privința stabilității tulpinii, pe care vaccinurile cu tulpini atenuate nu o au. Profilaxia specifică prin vaccinare se completează totdeauna prin măsuri de profilaxie generală, deratizare și deparazitare.

Tratamentul antimicrobian se face cu streptomicină, față de care bacilul pestei este foarte sensibil, și care este activă și în cazurile de pestă pulmonară. Excepțional, în cazurile grave, se asociază la tratament și serul antipestos.

PASTEURELLA TULARENSIS

***Pasteurella tularensis* sau *Bacterium tularense* a fost descoperit în 1911, în districtul Tulare, din S.U.A., de Mc Coy și Chapin, și este agentul etiologic al tularemiei. Tularemia este o epizootie a rozătoarelor, de la care se poate transmite la om prin contact direct cu animalul bolnav sau prin insecte vectoare.**

Căpușele *Dermacentor* transmit microbul și larvelor proprii, constituind astfel un rezervor de virus în natură; ele contaminează cel mai frecvent animalele și, accidental, omul. Se cunosc cazuri de contaminare de laborator în cursul diagnosticului, tularemia avînd o infecțiozitate mare.

***Pasteurella tularensis* este un cocobacil mobil foarte scurt, de 0,3—0,7 μ, cu pleomorfism marcat, putînd apărea sub formă de coci, de bacili și forme globuloase. Este Gram-negativ, se colorează bipolar cu tionină sau, mai bine, cu soluție Giemsa. Posedă o capsulă, cînd este proaspăt izolat din organism, pe care și-o pierde prin treceri pe mediile de cultură. Nu este sporulat. Nu cultivă pe mediile obișnuite, necesită medii speciale complexe cu sînge, ou și cistină (mediul Francis, mediul Mc Coy și Chapin sau Condrea). Se pot obține culturi frumoase în oul de găină embrionat, în urma inoculării în sacul vitelin al oului. Izolarea pe mediile de cultură se face cu greutate, dezvoltarea coloniilor are loc lent și uneori apar abia după 7 zile. Subculturile însă cresc repede, în 24 de ore.**

Coloniile sînt mici, transparente, pe mediul cu ou și gleroase, lactescente, pe mediul cu sînge.

Boala la om

Formele clinice de tularemie la om sînt condiţionate de calea de pătrundere şi localizare a bacililor. Există o formă ganglionară pură şi o formă ulceroganglionară datorită limfangitei şi adenopatiei regionale, cînd calea de pătrundere este cutanată.

Cînd poarta de intrare este conjunctiva oculară, apare o conjunctivită cu adenopatie periauriculară. Există şi forme septicemice secundare, cu localizări viscerale, cu formă tifică şi pulmonară. Evoluţia clinică a tularemiei se însoţeşte de febră permanentă la 38—39°, timp de 2—3 săptămîni. Prezintă o morbiditate ridicată, datorită infecţiozităţii deosebite. Mortalitatea este extrem de redusă.

Diagnosticul de laborator

Decelarea microbilor prin examen microscopic direct făcut pe frotiuri din produsul patologic nu este posibilă. De asemenea, izolarea lor prin însămînţări pe medii de cultură este uneori dificilă, datorită dezvoltării lente şi inconstante în culturi. În practica diagnosticului de laborator se foloseşte numai metoda de izolare *in vivo*, inoculînd produsul de cercetat (lichid de puncţie ganglionară, exsudat conjunctival, sînge sau mucozităţi din faringe) la şoarece şi cobai. Sensibilitatea şoarecelui la infecţia experimentală este aşa de mare, încît este suficient să introducem sub pielea şoarecelui acul care a servit la puncţia unui ganglion de la bolnav. Urmele de lichid ganglionar rămase pe ac în urma puncţiei reprezintă un inocul suficient pentru a determina infecţia experimentală.

Atît cobaiul, cît şi şoarecele fac o infecţie experimentală de tip septicemic cu evoluţie mortală în 2—4 zile. Leziunile infecţiei experimentale sînt identice la şoarece şi la cobai. Ganglionii limfatici axilari, din regiunea gîtului şi inghinali sînt hipertrofiaţi. Organele interne şi în special ficatul sînt congestionate. Pe suprafaţa ficatului apar mici noduli diseminaţi de 2—4 mm diametru. Splina este constant şi puternic hipertrofiată. Pe frotiurile-amprentă efectuate din splină se văd numeroşi cocobacili Gram-negativi sau coloraţi bipolar cu tionină fenicată. Din cordul animalului se prelevează sînge cu o pipetă Pasteur în condiţii de strictă asepsie şi se fac însămînţări pe mediile speciale cu ou şi în sînge.

Seroreacţia de aglutinare prezintă o mare importanţă în diagnosticul tularemiei la om. Aglutininele specifice apar în serul bolnavului în a doua săptămînă a bolii şi se menţin mult timp după vindecare. Reacţia de aglutinare se face cu un antigen formolat şi este de tip O somatic.

Antigenul tularemic este o suspensie în ser fiziologic de *B. tularensis*, omorîţi prin formol conţinînd 5 miliarde de microbi/ml.

Pentru efectuarea reacţiei, antigenul se foloseşte nediluat, iar serul de cercetat se va dilua 1/20—1/1280. Incubaţia se face la baia de apă de + 52° sau la termostat la 37°.

Citirea preliminară se face după o incubaţie de 2—3 ore la baia de apă şi definitiv, după păstrare de 24 de ore la temperatura camerei. Se consideră ca aglutinate pozitiv tuburile care, după 24 de ore, prezintă un depozit evident care, prin agitare, se suspendă în granule fine.

Reacţia este considerată prezumtiv pozitivă de la titrul 1/20 în sus, iar creşterea titrului la repetarea reacţiei ne confirmă elaborarea activă de anticorpi specifici.

Anticorpii aglutinanţi persistă mulţi ani după vindecarea bolnavului; de aceea, pentru a stabili că este vorba de o boală actuală, trebuie să urmărim totdeauna dinamica creşterii anticorpilor.

Intradermoreacţia la tularină. Bolnavii prezintă de la începutul bolii o stare de alergie faţă de bacilii tularemiei, care se menţine timp de mai mulţi ani. Ca antigen se foloseşte tularina, o suspensie de bacterii omorîte, din care se inoculează 0,1 ml intradermic. După 24 de ore se observă o papulă cu hiperemie şi edem cu diametrul de 1—2 cm, care persistă cîteva zile şi indică prezenţa alergiei tularemice. Reacţia persistă timp de 5—6 zile. Intradermoreacţia la tularină este strict specifică, este negativă la indivizii care nu au suferit de tularemie şi apare pozitivă la 93—95% din cazurile de boală. Întrucît alergia tularemică apare încă din a cincia sau a şasea zi de boală, poate fi considerată ca o reacţie de depistare precoce şi se întrebuinţează în focarele epidemice sau în regiunile endemice, ca un mijloc de a stabili morbiditatea prin tularemie.

Se cer precauţii speciale în laboratoarele unde se lucrează tularemie. Cei care lucrează în acest domeniu vor purta obligator haine de protecţie, mănuşi şi ochelari, deoarece microbul poate pătrunde şi prin conjunctivă şi pielea intactă.

Profilaxie: deratizare, dezinsectizare, vaccinare preventivă.

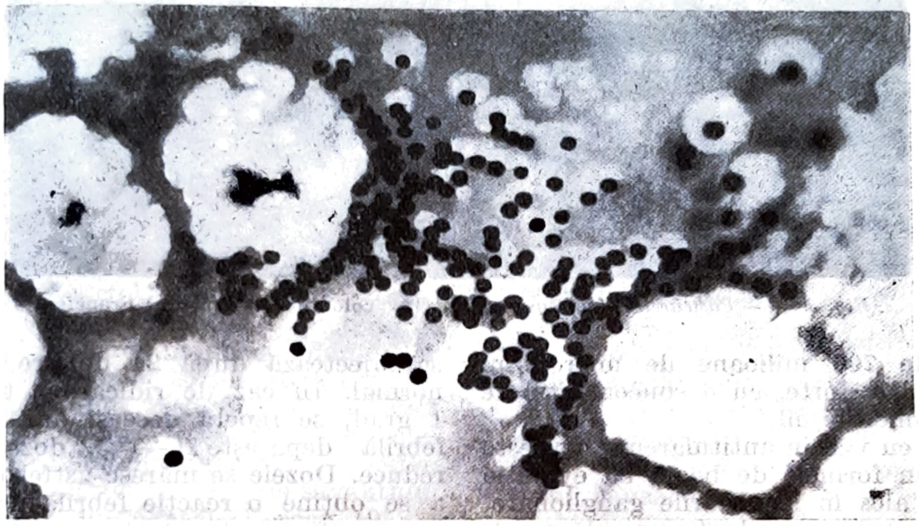


Fig. 358. — *Pasteurella tularensis.* Forme cocale dintr-un frotiu de singe de iepure (adaptare după Kolle şi Hetsch).

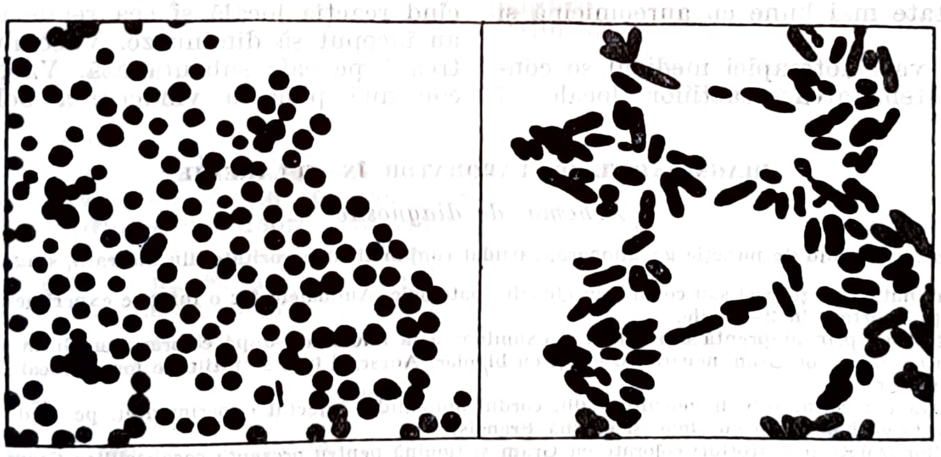


Fig. 359. — *Pasteurella tularensis.* Forme cocale dintr-o cultură veche şi transformarea lor în forme bacilare în subcultură pe mediul Francis.

Folosirea vaccinului antitularemic viu în prevenirea şi tratamentul tularemiei. Vaccinul antitularemic viu (după metoda Elbert şi Gaiski) este o suspensie de *Pasteurella tularensis* avirulentă, în ser fiziologic. Pentru profilaxia tularemiei se foloseşte un vaccin cu o concentraţie de 20 miliarde de microbi/ml. Se vaccinează în focarele de tularemie numai indivizii care prezintă reacţia intradermică negativă la tularină.

Se administrează în 3 injecţii de 1 ml, 2 ml şi 2 ml, la 3 zile interval, pe cale subcutanată.

Vaccinul antitularemic viu nu dă reacţii după primele două injecţii. La cea de-a treia injecţie de vaccin, unii vaccinaţi pot prezenta o uşoară reacţie locală şi generală, datorită sensibilizării. Mărirea intervalelor dintre injecţii provoacă o sensibilizare mai rapidă şi în consecinţă, reacţii locale şi generale mai supărătoare. Reuşita vaccinării se poate verifica prin evidențierea apariției alergiei la tularină.

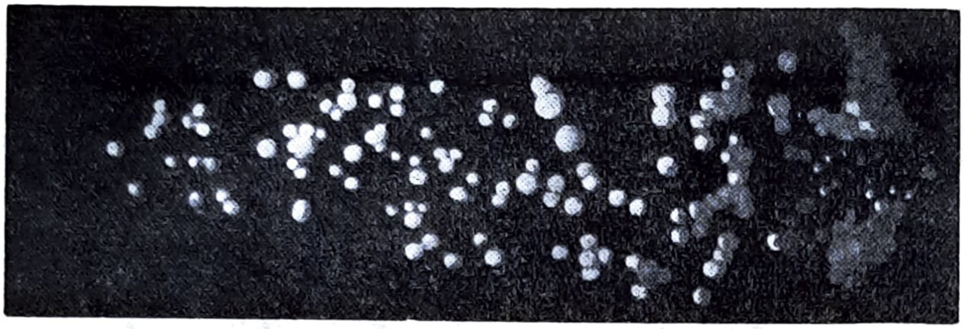


Fig. 360. — Pasteurella tularensis. Aspectul coloniilor pe mediul Francis.

Pentru tratamentul tularemiei se folosește un vaccin antitularemic curativ normal, cu o concentrație de 700 milioane de microbi/ml și vaccinul curativ forte, cu o concentrație de 7 miliarde de microbi/ml.

Tratamentul cu vaccin antitularemic viu este foarte eficace în formele de boală cu evoluție cronică și mai ales în localizările ganglionare, în care tratamentul cu antibiotice nu dă rezultate. Eficacitatea vaccinoterapiei este redusă în formele incipiente de boală : în aceste cazuri se obțin rezultate mai bune cu aureomicină și streptomicină.

În aplicarea vaccinoterapiei medicul se conduce după intensitatea reacțiilor locale și generale, tratamentul fiind individual. Cantitatea de vaccin care se injectează este în funcție de reacția generală. Prima doză este de 0,1 ml vaccin normal. Dacă nu apare reacția febrilă, se injectează după 24 de ore 0,2 ml vaccin normal. În caz de ridicare a temperaturii cu 1 grad, se repetă aceeași doză. Dacă reacția febrilă depășește 1—1°,5, doza următoare se reduce. Dozele se măresc astfel treptat, pentru a se obține o reacție febrilă ușoară, necesară pentru eficacitatea tratamentului specific. Intervalul dintre inoculări este determinat de reacția locală; inocularea următoare se face cînd reacția locală și cea regională, din focar, au început să diminueze. Vaccinul se administrează pe cale subcutanată. Vaccinoterapia se continuă pînă la vindecarea bolnavului.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN TULAREMIE

Schema de diagnostic

Produs patologic : lichid de puncție ganglionară, exsudat conjunctival, serozitate din ulcerații, sînge și spută

— Inoculare subcutanată la 2 șoareci sau cobai a produsului patologic. Animalele fac o infecție experimentală de tip septicemic cu evoluție mortală în 2—4 zile.

— Efectuarea de frotiuri prin amprentă din splină și examinarea la microscop după colorare cu Gram și tionină. Se va urmări prezența cocobacililor Gram-negativi colorați cu bipolar. Adeseori însă se întîlnesc forme cocale care se colorează și ele bipolar cu tionină.

— Însămînțări de sînge recoltat prin hemocultură din cordul animalului infectat experimental, pe medii complexe cu ou Condrea sau Mc Coy-Chapin sau cu sînge și cistină Francis.

— Controlul coloniilor izolate prin frotiuri colorate cu Gram și tionină pentru prezența cocobacililor Gram-negativi colorați caracteristic bipolar.

— Din a doua săptămînă de boală se poate cerceta prezența aglutininelor specifice în serul bolnavului. La început tuburile sînt scăzute între 1/20 și 1/50, dar după 3—4 zile ele cresc repede și ating valori de 1/2 500—1/10 000 și chiar 1/20 000. Deoarece anticorpii persistă mulți ani după vindecare, trebuie să urmărim prin reacții repetate dinamica creșterii aglutininelor pentru a putea înlătura interpretările eronate datorite reacțiilor anamnestice.

— Eventual din a III-a — a IV-a zi se poate efectua testarea apariției alergiei față de bacilii tularemiei, prin injectarea intradermică a 0,1 ml tularină. Reacțiile pozitive trebuie interpretate cu prudență în contextul celorlalte metode de diagnostic, datorită persistenței îndelungate a alergiei tuberculinice, de foștii bolnavi.

— Efectuarea buletinului de analiză se face descriind caracterele morfologice, tinctoriale și de patogenitate ale microbului izolat în cultură pură. Se completează prin rezultatul intradermoreacției la tularină.

— Nu este necesară testarea sensibilității la antibiotice, datorită sensibilității mari a bacililor tularemiei la streptomicină și aureomicină.

— Serodiagnosticul completează diagnosticul direct și rezultatul se eliberează numai după efectuarea a cel puțin 2 seroreacții consecutive la 3—4 zile interval, care confirmă creșterea titrului aglutininelor antitularemice.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU *BRUCELLA*

Familia : *Brucellaceae*. Genul : *Brucella*. Specia tip : *Brucella melitensis*

Generalități

Bruceloza este o zoonoză care se manifestă la oameni printr-o simptomatologie polimorfă și tendință la recidive și complicații.

Printre semnele de boală cele mai des întîlnite se descriu : febra neregulată, splenomegalia, inflamațiile și uneori, supurațiile la nivelul articulațiilor sacroiliace și coxofemurale.

La cornutele mici și mari și la porcine provoacă o stare septicemică, iar la animalele gravide, avort sau naștere prematură. Microbii genului *Brucella*, foarte răspîndiți în natură, pot fi considerați ca reprezentînd o bacterie în continuă schimbare care, în urma adaptărilor pe diferite specii animale, își modifică o parte din caractere, rămînînd însă capabilă oricînd să infecteze omul. Agentul etiologic al brucelozei este una din bacteriile genului *Brucella*, care a fost denumit astfel în memoria savantului englez Bruce și cuprinde 3 specii (Bergey, 1958) :

1. *Brucella melitensis* (Bruce).
2. *Brucella abortus bovis* (Bang).
3. *Brucella abortus suis* (Traum).

În țara noastră, cea mai răspîndită formă de bruceloză este cea dată de *Brucella abortus bovis*; mai rar se întîlnesc infecții umane cu *Brucella abortus suis* și cu totul excepțional cu *Brucella melitensis*.

Indiferent de specia de *Brucella*, bruceloza umană este totdeauna o infecție septicemică care se manifestă prin accese febrile intermitente însoțite de transpirații nocturne, dureri articulare și hipertrofia splinei. Accesele febrile durează de la cîteva zile la cîteva săptămîni și sînt separate prin perioade de remisiune cînd temperatura este aproape normală. După trecerea etapei acute, infecția bruceloasă evoluează sub forma cronică, ani de zile, întreruptă de recăderi febrile. Datorită acestei alternanțe între perioadele febrile și cele afebrile sau cu subfebrilitate, boala a primit denumirea de febră ondulantă.

Caractere morfologice

Coci ovalari de 0,5 – 0,2 μ, care se pot prezenta și sub formă alungită de 0,6 – 1 μ (cocobacil), imobili cu capsulă, fără spori, Gram-negativ și cu un antigen glucidolipidic comun. Paraziți obligatoriu, invadează toate țesuturile organismului infectat și se localizează de preferință în organele genitale, glandele mamare, arborele respirator și tractul intestinal.

Caractere de cultură

Brucelele necesită, pentru creștere, temperatura de 37°, pH al mediului de 6,6 – 6,8 și pentru *Br. abortus*, la prima izolare, obligatoriu atmosferă cu 10% CO_2. Mediul optim pentru izolare este bulionul-ficat.

După izolare, subculturile pot fi menținute pe orice mediu uzual.

Diagnosticul de laborator

În infecția umană, diagnosticul de laborator se face, în raport cu perioada bolii, în mod direct și indirect.

Direct se cercetează și se pune în evidență agentul cauzator în :

— sînge (hemocultură) ;

— urină (urocultură) ;

— puroiul focarelor de periostită sau artrită (culturi).

Din oricare din aceste produse se poate face izolarea agentului etiologic prin inoculare la cobai, care constituie o metodă eficace de diagnostic.

Indirect, prin determinarea stării de imunitate și a reactivității organismului :

— serodiagnosticul ;

— reacția alergică la melitină, abortină, lizate microbiene sau extrase microbiene.

La animale se folosesc în diagnostic *examene directe* prin :

— culturi din lapte, lohii, organe ale fetusului și sînge ;

— inocularea la cobai din produsele arătate mai sus sau a culturilor de brucele obținute din ele.

Se pot folosi și *examenele indirecte* prin :

— serodiagnostic ;

— lactoaglutinare ;

— reacții alergice.

Hemocultura. Pentru ca șansele să fie mai mari în obținerea rezultatelor pozitive, se recomandă efectuarea ei în perioada febrilă de la debutul bolii, în momentul cînd febra prezintă maximul zilnic. Se recoltează o cantitate de 20 ml de sînge, care se repartizează egal în două baloane de cîte 200 ml cu bulion-ficat.

Un balon se menține în aerobioză la 37° într-o atmosferă obișnuită, iar al doilea, la aceeași temperatură și o atmosferă cu 10% CO_2.

Creșterea brucelelor este lentă și după cîteva zile, în cazul culturilor pozitive, bulionul se tulbură fin, fără a forma văl. Datorită faptului că dezvoltarea microbilor în culturile inițiale din produsele patologice se face foarte încet, culturile se mențin 21—45 de zile la termostat, în care interval se fac treceri pe geloză-ficat sau bulion-ficat, la fiecare 2 zile.

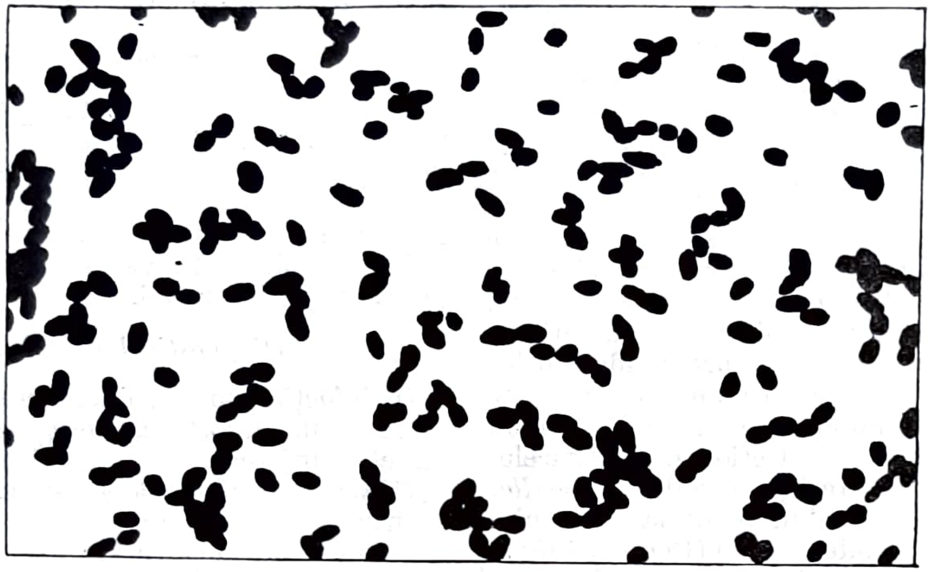


Fig. 361. — *Brucella abortus bovis.* Frotiu din cultură pe bulion-ficat (colorație Gram).

O hemocultură se consideră negativă numai după 45 de zile de incubație în atmosferă obișnuită și cu adaos de CO_2.

Pentru a simplifica tehnica hemoculturii lor se mai folosește metoda Castaneda care prezintă marele avantaj că dispensează de treceri repetate și înlătură astfel riscul contaminărilor secundare ale mediului. Principiul metodei constă în a reuni în același recipient atît mediul lichid de însămînțat, cît și mediul solid pentru treceri. Sîngele bolnavului devine substratul cel mai important pentru dezvoltarea germenilor. Se folosesc medii cu macerat de carne, după Castaneda, bulion-ficat și geloză-ficat, după Huddleson, sau medii cu macerat din cord de bou sau placentă cu adaos de antibiotice, după Mair.

Se repartizează în două baloane Erlenmeyer (de 100—150 ml) 4—5 ml mediu gelozat Castaneda; se înclină balonul și se lasă să se întărească pe un perete. Apoi se repartizează cîte 10 ml bulion citratat Castaneda. Se controlează 24 de ore la 37°.

De la fiecare bolnav se însămînțează două baloane, cu cîte 5 ml sînge. Unul din baloane va fi incubat în atmosfera cu conținut de 10% CO_2.

Trecerile se fac prin simpla înclinare a flaconului pentru a însămînța amestecul de sînge cu mediul lichid pe suprafața gelozei. La fiecare 48 de ore se face o nouă înclinare. Coloniile care apar în primele 24—48 de ore nu sînt brucele, ci floră de contaminare.

În acest mod rezultatele pozitive se obțin în 65—80% din cazuri. Pe mediul cu geloză-ficat sau Castaneda brucelele se dezvoltă în 24—72 de ore, coloniile izolate sînt mici, transparente, cu diametrul de 2—3 mm și devin apoi opalescente, reliefate și cu aspectul de porțelan. Din culturile în bulion-ficat sau din coloniile pe geloză-ficat, obținute la trecerea din bulion, se fac frotiuri care se colorează Gram; germenul apare de aspect cocobacilar, de 0,6—1,2 μ, aranjat uneori în diplo sau lanțuri scurte fiind Gram-negativ.

Brucelele nu fermentează nici un zahăr, nu au acțiune hemolitică și nu produc indol.

Pentru identificarea tipului de *Brucella*, reacțiile de aglutinare cu serurile anti-brucela sau reacțiile de fixare a complementului ne dau, de multe ori, rezultate neconcludente, datorită structurii antigenice, care diferă doar cantitativ de la un tip microbian la altul.

Diferențierea tipului de *Brucella* se face prin cercetarea caracterelor, stabilite de Huddleson:

— cercetarea acțiunii CO_2 asupra dezvoltării microbilor;

— modul de producere a H_2S;

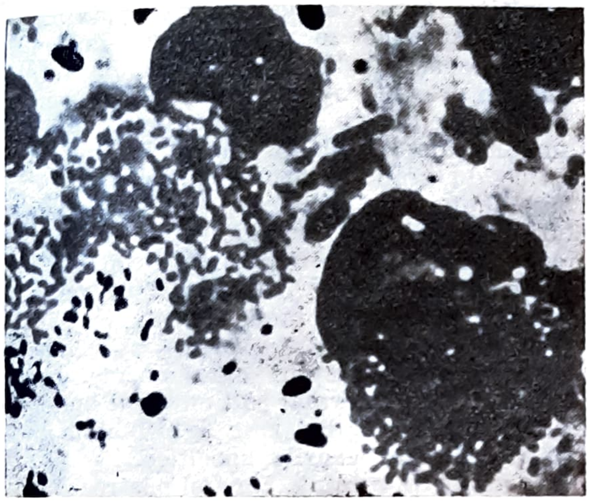


Fig. 362. — Frotiu din exsudat placentar după avort spontan. Se văd grămezi de *Brucella abortus*, un fagocit plin cu microbi fagocitați și floră banală din coci și bacili (colorație tionină fenicată).

— acțiunea bacteriostatică a coloranților.

Dezvoltarea *Br. melitensis* și a *Br. suis* se face bine pe mediile de cultură menținute la termostat într-o atmosferă obișnuită de aer, în timp ce pentru obținerea de culturi inițiale de *Br. abortus bovis* este necesară o atmosferă de CO_2 în proporție de 5—10%. Fac excepție de la această regulă doar cîteva tulpini, care s-au putut dezvolta inițial în atmosferă obișnuită. Producerea hidrogenului sulfurat se cercetează pe un mediu de geloză-ficat.

Pentru cercetarea producerii H_2S în culturile pe mediul lichid se utilizează un bulion de ficat.

După însămînțarea microbului, între dopul eprubetei și perete se așază o bandă de hîrtie impregnată în soluție de subacetat de plumb 10%. La fiecare 24 de ore, timp de 4 zile consecutiv, se scoate de la termostat tubul însămînțat și se înlocuiește banda de hîrtie cu alta nouă, pregătită în aceleași condiții.

Degajarea H_2S produs în urma metabolismului microbian se face timp de 24 de ore sau uneori lipsește complet la *Br. melitensis*. *Br. abortus bovis* produce hidrogen sulfurat timp de 48 de ore de la însămînțare, după care încetează. *Br. abortus suis* produce abundent H_2S timp de 96 de ore.

Înnegrirea hîrtiei cu subacetat de plumb, observată zilnic ca urmare a combinării hidrogenului sulfurat cu subacetat de plumb, pune în evidență modul de producere a H_2S la tulpina cercetată. Acțiunea bacteriostatică a coloranților se cercetează adăugînd soluție apoasă 1/30 000 tionină și soluție apoasă de 1/25 000 fucsină la mediul cu geloză-ficat. Se însămînțează tulpina de cercetat pe mediile pregătite cu tionină și fucsină și se mențin la termostat la 37° o serie de tuburi în atmosferă obișnuită și o altă serie cu CO_2 10%. După 72 de ore se constată că:

— *Brucella melitensis* crește atît pe mediile cu soluție de fucsină, cît și pe cele cu tionină;

— *Brucella abortus bovis* crește pe mediul în care s-a adăugat, ca bacteriostatic, fucsina și nu crește pe cel în care s-a adăugat tionină;

— *Brucella abortus suis* crește pe mediul cu tionină și nu se dezvoltă pe mediul cu fucsină în diluțiile arătate.

Redăm tabelul stabilit de Huddleson pentru cercetarea tipurilor de *Brucella*:

TABELUL 130

Tipuri sau varietăți	Cultură în atmosferă fără CO_2	Producere de H_2S			Mediul cu tionină 1/30 000	Mediul cu fucsină 1 25 000
		24h	48h	96 h		
Br. melitensis	+	+	0	0	+	+
Br. abortus bovis	0	++	+	0	0	+
Br. abortus suis	+	+++	++	++	+	0

Diferențierea tipurilor de brucele cu ajutorul animalelor de laborator cere timp îndelungat și de aceea nu se folosește pentru diagnostic.

Adenocultura. Uneori, în formele subacute și cronice de boală, datorită localizării brucelelor exclusiv intracelular în țesuturile infectate și existenței anticorpilor și a altor substanțe inhibitoare din sînge, este util, pentru a mări șansele de izolare, să asociem hemoculturii adenocultura. Pentru aceasta se recoltează aseptic un ganglion care se mojarează steril și se însămînțează apoi într-o serie de 6 tuburi cu geloză-ficat, din care 3 se termostatează obișnuit și 3 în atmosferă cu CO_2. Rezultatele sînt deosebit de bune dacă există concomitent o hipertrofie ganglionară. Se poate, de asemenea, asocia medulocultura, utilizînd sînge obținut prin puncție sternală.

Urocultura. Din urină, agentul se cercetează după recoltare în mod steril și centrifugare; sedimentul se însămînțează pe medii cu adaos de antibiotice după Mair și se urmărește ca și pentru examenul de sînge.

Puroiul din periostite sau abcese, extras prin puncție, se însămînțează pe geloză-ficat și culturile se urmăresc ca mai sus.

Ovocultura. Oul de găină embrionat este susceptibil să fie infectat experimental cu *Brucella*. Se folosește la izolarea brucelelor din sînge. Inoculările se fac în sacul vitelin al embrionilor în vîrstă de 5 zile cu 0,5 ml sînge de la bolnav. Prezența brucelelor în inocul determină moartea embrionului în 5—10 zile. Diagnosticul se stabilește prin deschiderea aseptică a ouălor, extragerea și triturarea embrionului cu efectuarea de subculturi pe medii cu geloză-ficat și eventual frotiuri prin amprentă din organe care se colorează cu Giemsa și Gram.

Infecția experimentală. Atît cu produsele în care se urmărește prezența brucelelor, cît și cu culturile obținute din ele se poate cerceta puterea patogenă experimentală.

Animalele sensibile în cel mai înalt grad sînt maimuța și capra. Școala sovietică, în frunte cu Zdrodovski, a adus metode noi și studii însemnate în acest domeniu. Zdrodovski a arătat că rezultatele discordante obținute în inoculările pe cobai se datorau utilizării, în afara tulpinilor virulente și a unora care, trecute pe mediile de cultură, și-au pierdut din patogenitate sau au devenit complet nepatogene. Păstrarea virulenței tulpinilor în decursul perioadei de experimentare se face prin liofilizare. Cobaii sînt sensibili la inoculările cu brucele virulente pe căile transcutanată, conjunctivală, orală, subcutanată, intramusculară, intravenoasă și intraperitoneală. Cele mai sensibile căi de inoculare sînt cea intravenoasă și cea intraperitoneală. Cobaii prezintă febră, slăbire în greutate, leziuni articulare, abcese ale părților moi, epididimită și orhită. Alții nu fac infecție aparentă; în aceste cazuri, diagnosticul se face fie prin cercetarea aglutininelor din serul lor, fie în urma sacrificării animalului, prin însămînțarea din organe, ca splină și măduvă osoasă, din care se obțin culturi pozitive. În cursul procesului infecțios animalele trec prin 3 faze:

— faza de adaptare, cînd brucelele nu se obțin în culturi, cu toate că animalele au fost infectate;

— faza de infecție regională, cu însămînțarea pozitivă din ganglionii limfatici corespunzători locului de introducere a germenului;

— ultima fază, de „generalizare'' a infecției în care brucelele se pot cultiva din splină, măduvă osoasă și din alte organe. La autopsie animalele prezintă splina hipertrofică cu noduli și abcese, noduli în ficat, ganglioni, epididim; examenul histopatologic arată leziuni caracteristice de granulomatoză bruceloasă.

Serodiagnosticul prin punerea în evidență a aglutininelor pentru *Brucella* este o reacție care, corect executată, are mare importanță în practică, căci constituie cel mai bun mijloc de diagnostic folosit în mod curent.

Erorile sînt evitate, prin utilizarea ca antigen a unor tulpini care nu aglutinează spontan cu serul normal sau cu serul bolnavilor de alte afecțiuni, dar sînt aglutinabile la un titru ridicat de serurile specifice.

Cu o astfel de tulpină, care își păstrează stabilitatea prin treceri succesive, se face o suspensie în soluție clorurosodică 8,5‰ a unei culturi de 48 de ore, apoi se încălzește la 60° o oră și se formolează 0,1%. Concentrația în brucele se măsoară prin nefelometrie, în comparație cu o suspensie standard.

În U.R.S.S., antigenul standardizat este o suspensie de brucele cu un miliard de microbi pe ml, formolată 0,5%; și fenolată 0,5% această suspensie poartă denumirea de *diagnosticum*. Încălzirea serurilor de cercetat la 56°, timp de 20 de minute, se recomandă pentru înlăturarea aglutinărilor nespecifice. Se folosește în reacția tehnică preconizată de Wright.

Antigenul Wright este o suspensie de brucele, în concentrație de 10 miliarde germeni pe ml în soluție clorurosodică 8,5‰ formolată 5‰.

Modul de întrebuințare. În momentul efectuării reacției, antigenul Wright se diluează 1/10 cu soluție clorurosodică 8,5‰.

Din serul de examinat se fac, în tuburi de aglutinare, diluții în soluție clorurosodică 8,5‰ peste care se adaugă o cantitate fixă de 0,5 ml din suspensia antigenică (diluată 1/10), după tabelul 131.

Se agită tuburile și se lasă la 37°, timp de 24 de ore, și apoi o oră la temperatura camerei.

Se consideră reacție pozitivă prezența unui sediment în formă de umbrelă cu lichidul supernatant perfect limpede; prin agitare, sedimentul

TABELUL 131

Tubul nr.	1	2	3	4	5	6	martor
Ser suspect (ml)	0,08*						
Ser fiziologic (ml)	0,92	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Diluția serului	1/12,5	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	
Antigen Wright diluție 1/10 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Diluția finală	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	

* După amestec, 0,5 ml se scot și se repartizează în tubul nr. 2 și așa mai departe, pînă la tubul nr. 6.

se desface sub formă de granule. Reacția este negativă cînd suspensia rămîne omogen tulbure.

Notarea reacției. În comparație cu martorul antigen, intensitatea aglutinării se notează astfel:

++++ = aglutinare totală cu limpezirea completă a supernatantului.
+++ = aglutinare 75% cu limpezirea aproape completă a supernatantului.
++ = aglutinare 50% fără limpezirea supernatantului.
+ = aglutinare 25% fără limpezirea supernatantului.

Titrul de diagnostic este la diluția de 1/100, dacă intensitatea aglutinării este minimum 50% (++).

Titrul aglutinant limită al unui ser este reprezentat de diluția cea mai mare, la care intensitatea este corespunzătoare aglutinării 50% (++).

Interpretarea reacției se face în modul următor:

aglutinarea (+) la diluția de 1/50 a serului este socotită dubioasă;

la titrul 1/100 (++), slab pozitivă;

la titrul 1/200—1/400 (+++), pozitivă;

la titrul 1/800 (++++) sau mai mult, intens pozitivă.

În unele cazuri de aglutinare paradoxală apare fenomenul de zonă, în primele diluții nu apare aglutinare, urmează apoi cîteva tuburi unde s-a produs aglutinarea, apoi altele fără de aglutinare și din nou, cîteva cu aglutinare pozitivă. Rezultatul este dat de diluția cea mai mare, în care aglutinarea este evidentă. Serodiagnosticul se face începînd din a șasea zi de boală.

Reacția de aglutinare pe lamă cu antigen colorat Huddleson, este o metodă de orientare la patul bolnavului și se folosește îndeosebi în depistările pe teren; prezintă avantajul că este mai simplă și mai rapidă.

Serul folosit este inactivat, iar antigenul este o suspensie fenolată de brucele, la care se adaugă violet de gențiană și verde briliant. Pentru efectuarea reacției, se amestecă o picătură din serul de cercetat cu o picătură de antigen colorat, pe o placă de sticlă (se pot examina simultan mai multe probe). Dacă picătura se decolorează complet și apar flocoane mari de brucele aglutinate, aglutinarea este totală (++++). În funcție de intensitatea aglutinării și gradul de decolorare, se înregistrează aglutinări 75% (+++), 50% (++), 25% (+) și rezultate dubioase cu (±).

În procedeul rapid elaborat de Brumpt se folosește o tulpină verificată de *Brucella abortus*; într-o soluție de citrat de sodiu 10% se face o suspensie densă din această tulpină: 10 miliarde bacterii/ml dintr-o cultură de 48—72 ore, formolată 0,2‰. Pe o lamă curată se pune cîte o picătură mare de antigen la ambele capete ale lamei și se adaugă la unul din ele o picătură de sînge recoltat prin înțeparea degetului, iar la celălalt, soluție clorurosodică 8,5‰. Se amestecă bine, prin înclinarea lamei, și în interval de 2—4 minute se citește reacția. Îngrămădirea globulelor roșii în centrul picăturii și formarea de granule albe la periferia ei, prin aglutinarea microbilor, constituie o reacție pozitivă. Amestecul rămas omogen constituie o reacție negativă. Aglutinările tardive nu trebuie luate în considerație în aprecierea rezultatului.

În cazul folosirii reacțiilor de aglutinare în diagnosticul brucelozei, trebuie ținut seama de faptul că, puterea aglutinantă a serului prezintă variații mari, uneori la intervale scurte, putînd chiar să dispară. Puterea aglutinantă se evidențiază mai ales în prizele sanguine din momentul remisiunilor febrile matinale.

Indicele opsono-citofagic (*I.O.C.*). Antigenul brucelos pentru I.O.C. este o suspensie în soluție clorurosodică 8,5‰ de *Brucella*, inacti-

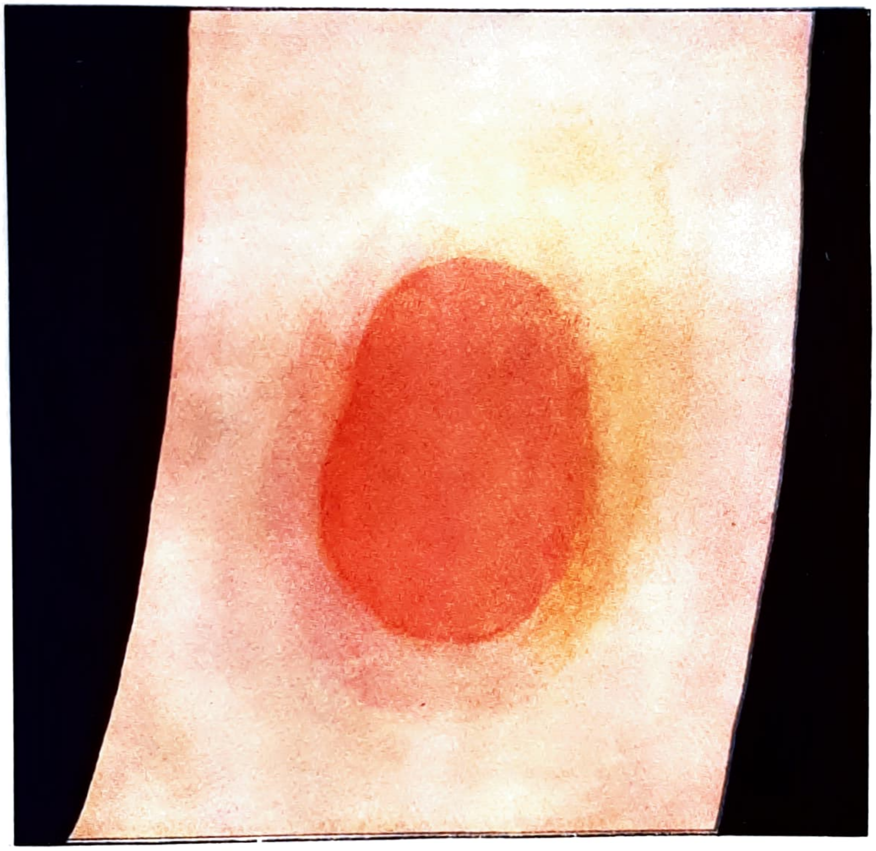


Fig. 363. — Intradermoreacție intens pozitivă la brucelolizat.

vată prin căldură, care conţine 4 miliarde bacterii/ml.

Modul de întrebuinţare. Într-un tub de aglutinare se amestecă prin agitare:

0,25 ml antigen I.O.C.;

0,25 ml soluţie sterilă 2% de natriu citric;

0,50 ml sînge recoltat proaspăt.

Se lasă 20 de minute la 37°.

Se fac frotiuri pe lame perfect degresate, care se fixează în mod obişnuit cu alcool-eter sau cu alcool metilic şi se colorează cu soluţie Giemsa sau cu soluţie de albastru de toluidină.

Frotiurile se examinează la microscop. Se cercetează pe diferite porţiuni 25 de polinucleare neutrofile bine conservate şi se apreciază gradul de fagocitoză care a avut loc, numărîndu-se microbii fagocitaţi în citoplasma fiecărui element. Pe baza cifrei înregistrate, elementul respectiv este grupat în una din cele 4 categorii de intensitate a fagocitozei, după schema din tabelul 132.

TABELUL 132

Schema calculării unui indice opsono-citofagic

Nr. brucelelor pe fagocit	Cum se caracterizează fagocitoza	Notarea intensităţii	Nr. neutrofilelor	Calcularea indicelui
0	Negativă	0	6	6×0=0
1–20	Slabă	+	12	12×1=12
21–40	Moderată	++	5	5×2=10
peste 41	Pronunţată	+++	2	2×3=6
Total			25	28

Totalizînd aceste rezultate, se poate calcula indicele opsono-citofagic. Teoretic, indicele de fagocitoză maxim este de 75. Această cifră se obţine multiplicînd numărul maxim de neutrofile (25) cu intensitatea maximă posibilă a fagocitozei (+++ = 3), deci 25 × 3.

După Huddleson, rezultatul determinării I.O.C. se exprimă astfel în raport cu intensitatea fagocitozei:

0–10 = indice negativ (–)
11–24 = indice slab pozitiv (+)
25–49 = indice pozitiv (++)
50–75 = indice intens pozitiv (+++)

Interpretarea rezultatelor. Indicele opsonocitofagic poate preciza gradul de rezistenţă a organismului faţă de infecţia bruceloasă.

Indicii 1–24 arată un individ susceptibil la infecţie.

Indicii 25–49 sînt caracteristici pentru bolnavii de bruceloză.

Indicii 50–75 denotă imunitate.

La indivizi sănătoşi indicele este în general 0 sau variază între 1 şi 5. În cursul brucelozei, indicele oscilează, creşterea lui arătînd un prognostic favorabil. În formele latente de bruceloză indicele este foarte crescut, pe cînd în formele septicemice, indicele are valori foarte joase. Valoarea clinică a indicelui opsonocitofagic trebuie interpretată în complexul reacţiilor seroalergice, pe care le prezintă bolnavul.

Intradermoreacţia la melitină sau brucelină este o metodă de a diagnostica bolnavii sau convalescenţii cînd condiţiile unei hemoculturi sau ale unui diagnostic serologic nu pot fi îndeplinite.

Este o reacţie care pune în evidenţă starea alergică a bolnavilor sau convalescenţilor cu ajutorul unor filtrate de cultură, extrase sau lizate de *Brucella.*

Burnet a denumit melitină filtratul unei culturi de *Br. melitensis* în bulion, avînd o vechime de 20 de zile. În practica curentă se foloseşte brucelina, filtratul de *Br. abortus* în aceleaşi condiţii, care evită pericolul mare pe care-l prezintă pentru lucrătorii din laborator manipularea *Br. melitensis.*

Brucelina este un filtrat obţinut din culturile de 20 de zile, în bulion peptonat, ale tulpinilor de *Br. abortus* şi *Br. suis.*

Tehnica. Pe faţa anterioară a antebraţului se injectează strict intradermic 0,1 ml brucelină.

Citirea reacţiei se face la 24 şi 48 de ore, cînd reacţia pozitivă are intensitatea maximă, caracterizată prin eritem şi edem. Reacţiile care dispar în primele 24 de ore sînt considerate ca nespecifice şi negative.

Reacţia se notează astfel:

++++ = reacţie foarte intensă; edem şi eritem cu diametrul peste 6 cm; uneori fenomene generale (febră, cefalee); reacţia poate persista 2–6 zile;
+++ = reacţie intensă; edem şi eritem cu diametrul de 4–6 cm; reacţia poate persista 2–6 zile;
++ = reacţie moderată – pozitivă; edem şi eritem cu diametrul de 3–4 cm; durata 1–4 zile;
+ = reacţie uşoară – slab pozitivă; edem şi eritem net, cu diametrul de 1–2 cm;
± = reacţie dubioasă, cu eritem uşor, dar fără edem.

Reacţia este pozitivă începînd din a opta zi de boală, se accentuează în cursul evoluţiei, scade în convalescenţă şi dispare după vindecare.

Zdrodovski, în U.R.S.S., foloseşte pentru reacţie un brucelolizat cu proprietăţi asemănătoare melitinei sau abortinei şi care poate fi comparat, în mare măsură, cu antigenul O, de natură glucido-lipidică, extras din tulpinile S de *Brucella*.

Brucelolizatul are avantajul că este precis dozabil, stabil şi nu sensibilizează organismul.

Diagnosticul de bruceloză la animale

Laptele animalelor bolnave este centrifugat în condiţii aseptice, iar depozitul se însămînţează pe medii de geloză-ser glicerinată. Recent se foloseşte izolarea brucelelor din lapte prin inocularea unei cantităţi din produsul suspect pe membrana corioalantoidiană a oului de găină embrionat. Creşterea microbului este considerabilă după 4 zile de incubaţie la 37°. Din laptele infectat se poate face inocularea subcutanată a 1—2 ml la cobai care, după observare timp de 6—8 săptămîni, sînt sacrificaţi şi se fac culturi din splină şi cercetarea aglutininelor în ser.

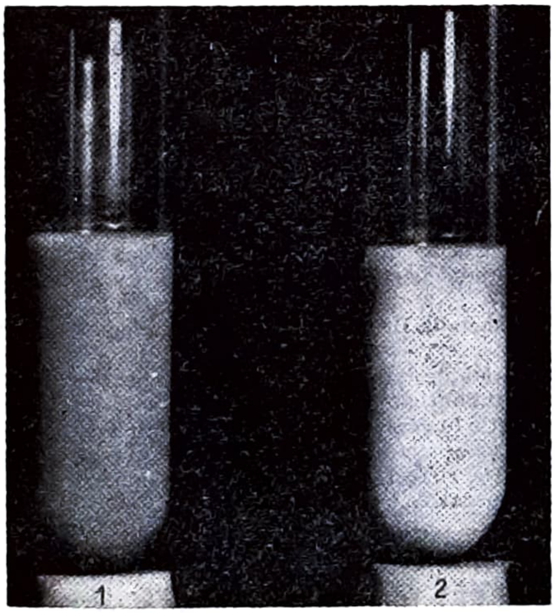


Fig. 364. — Reacţie inelară cu antigen Trilenko pentru decelarea anticorpilor bruceloşi în lapte : 1. reacţie negativă ; 2. reacţie pozitivă (colecţia autorului).

Pentru cercetarea aglutininelor din lapte se poate utiliza metoda lactoaglutinării cu antigen Trilenko, întrebuinţînd o suspensie de *Br. abortus*, omorîtă prin căldură şi colorată cu trifeniltetrazoliu. Se foloseşte în reacţie 1 ml de lapte proaspăt + 1 picătură de antigen colorat Trilenko. Se aşază amestecul la termostat la 37°, timp de 15—40 de minute sau 2—3 ore la temperatura camerei.

Citirea reacţiei se face cu ochiul liber, fără a agita tuburile. Reacţia este pozitivă dacă la suprafaţa coloanei de lapte apare un inel colorat în roşu, de cîţiva milimetri, iar restul coloanei s-a decolorat. Dacă toată coloana a rămas colorată uniform în roz şi la suprafaţă a apărut un inel alb, reacţia este negativă. În raport cu grosimea inelului şi gradul de decolorare a coloanei de lapte, intensitatea reacţiei se notează în modul următor :

++++ = inel roşu de 2—4 mm, delimitat precis, restul coloanei alb ;
+++ = inel roşu de 2—4 mm, nedelimitat precis, restul coloanei nedecolorată total ;
++ = inel nedelimitat bine, de culoare roşu spălăcit, coloana de lapte colorată roz ;
+ = inel de 1—2 mm, nedelimitat, foarte spălăcit, iar coloana de lapte colorată uniform roz.

Sensibilitatea la antibiotice şi chimioterapice

Antibioticele reprezintă tratamentul cel mai eficace în cazurile incipiente de bruceloză. În formele cronice, trenante, numai asocierea lor cu vaccinoterapia poate da rezultate. Streptomicina, cloramfenicolul şi tetraciclinele (teramicina şi mai ales aureomicina) sînt deosebit de active asupra brucelelor *in vitro*.

La bolnavi se obţin rezultate mai bune, prin asocierea antibioticelor celor mai active. Asocierea streptomicină-aureomicină pare a fi cea mai activă.

Sulfamidele au o acţiune sinergică cu cea a streptomicinei.

În cazurile de bruceloză cronică, în care nu se obţin rezultate cu antibiotice, trebuie să presupunem că microbul este cantonat în focare viscerale profunde, unde nu este uşor accesibil antibioticul. În toate aceste cazuri asocierea vaccinoterapiei cu vaccin antibrucelos, prin reacţiile congestive de focar pe care le determină în organismul bolnavului, facilitează pătrunderea antibioticelor şi stimulează mecanismele de apărare antiinfecţioasă. Tot în scopul unei mai bune difuzări a antibioticelor în focarele viscerale de bruceloză se asociază, în ultimul timp, cu anumită prudenţă corticoterapia.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL BRUCELOZEI

Schema de diagnostic A

(bruceloza acută)

Produs patologic: sînge.

- Se recoltează sîngele pentru hemocultură în 2 baloane pe mediu cu ficat sau preferabil după metoda Castaneda.
- Se incubează la 37° separat, un balonaş la 37° în atmosferă de 10% CO_2.
- La fiecare 48 de ore se înclină balonaşele şi se controlează apariţia coloniilor de *Brucella*.
- Din coloniile mici bine reliefate cu aspectul porţelanului se fac subculturi în bulion-ficat şi geloză-ficat, pentru obţinerea culturii pure şi frotiuri colorate Gram.
- Identificarea brucelelor prin cercetarea caracteristicilor biochimice, producerea de H_2S, acţiunea CO_2 şi comportarea faţă de tionină şi fucsină.
- O hemocultură pentru bruceloză se menţine sub observaţie la termostat minimum 45 de zile înainte de a o considera negativă.
- În paralel cu hemocultura se poate încerca izolarea brucelelor din sînge prin :
  - a) inoculare la cobai ;
  - b) ovocultură ;
  - c) urocultură ;
  - d) adenocultură.

Din săptămîna a 2-a de boală se poate efectua diagnosticul serologic :

- a) reacţia de orientare pe lamă Huddleson ;
- b) reacţia de aglutinare în tuburi Wright, cu urmărirea creşterii titrului aglutinant al serului de cercetat ;
- c) reacţia de fixare a complementului cu antigen brucelos standard ;
- d) I.D.R. la brucelină.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL BRUCELOZEI

Schema de diagnostic B

(bruceloza latentă sau cronică)

În bruceloza latentă sau cronică există şanse reduse de a izola microbii din organism. Se pot face următoarele încercări :

- Izolare prin tehnica hemoculturii după metoda Castaneda.
- Izolare din sînge prin tehnica inoculării intraperitoneale la cobai sau în oul embrionat.
- Izolare prin adenocultură pe geloză-ficat Huddleson.
- Izolare prin urocultură prin însămînţarea sedimentului pe medii cu adaus de antibiotice după Mair.
- Izolare prin însămînţarea exsudatului purulent din abcese şi periostite pe medii cu adaos de antibiotice după Mair sau pe bulion şi geloză-ficat după Huddleson.

De obicei se asociază 3—4 metode de izolare şi se urmăresc simultan. Cînd folosim metodele de izolare prin însămînţare, vom efectua totdeauna 2 serii pe care le vom incuba separat la 37°, în atmosferă obişnuită şi cu adaos de 10% CO_2.

Concomitent cu încercările de izolare se vor efectua reacţiile de serodiagnostic, decelarea alergiei bruceloase şi stabilirea indicelui opsono-citofagic.

- Reacţia de aglutinare pe lamă cu antigen colorat după Huddleson sau metoda Brumpt, numai ca metodă de orientare rapidă pentru decelarea calitativă a aglutininelor anti-*Brucella*.
- Reacţia de aglutinare în tuburi cu antigen Wright. Se va urmări în special creşterea titrului aglutininelor prin repetarea seroreacţiei. Reacţiile de aglutinare negative trebuie completate cu testul antiglobulinic Coombs.
- Intradermoreacţia la brucelină reprezintă o metodă valoroasă de diagnostic în acest stadiu al infecţiei bruceloase.
- Determinarea indicelui opsono-citofagic după tehnica Huddleson, care în acest stadiu al bolii este foarte crescut.

Diagnosticul de bruceloză se stabileşte prin coroborarea datelor clinice cu cele ale diagnosticului complex seroalergic, atunci cînd încercările de izolare a brucelelor din organism sînt constant negative.

BIBLIOGRAFIE

ALEXENKO M. I. — Reacţia opsonofagocitară în bruceloza umană, *Sovestk. Med.*, 1950, nr. 4, p. 163—168.

AKIJEV A. K. — Dinamica reacţiei opsonofagocitară în bruceloza umană, *Sovetsk. Med.*, 1950, nr. 11, p. 715—718.

ANGHELOFF S., KUJUMGIEFF I. — Asupra standardizării metodei de aglutinare în serodiagnosticul brucelozei la noi, *Bull. Inst. Microb., Acad. Bulgare Sci.*, 1951, vol. 2, p. 29—54.

BIRGHER O. G. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, (antraxul). Ed. de Stat pentru lit. ştiinţ., Bucureşti, 1952 (traducere din limba rusă), p. 425—434.

BÜRKI F., FEY H. — Testul de blocare şi reacţia Coombs modificată în serodiagnosticul brucelozei umane, *Schweiz. Z., allg. Path.*, 1953, vol. 16, p. 945—954.

CAIMAŢOVA G. I., — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase (Bruceloza), Ed. de Stat pentru lit. ştiinţ., Bucureşti, 1952 (traducere din limba rusă), p. 410—425.

CASTANEDA M. R. — Laboratory diagnosis of brucellosis in man, *Bull. O.M.S.*, 1961, nr. 24, p. 73—84.

CASTANEDA M. R. — O metodă practică pentru hemocultura de rutină în bruceloză, *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1947, vol. 64, p. 114—116.

CATTANEO A. — Richerchi sull medulo-cultura nelle brucellosi, *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 1943, vol. 22, p. 5—8.

COLIAKOV IA. E. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase (traducere din limba rusă), Ed. de stat pentru lit. ştiinţ. Bucureşti, 1952, p. 434—442.

DALRYMPLE-CHAMPNEYS W. — Brucella infection and undulant fever in man, Ed. Oxford University Press, Londra, 1960.

DUMAS J. — Bactériologie médicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 350—353.

GAIGINSKI ALEXANDRINA — Bacteriologie medicală, Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 610—616.

GASTINEL P. — Précis de Bactériologie Médicale, ediţia a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 591—612 ; 526—544 ; 485—515 ; 518—525.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ediţia a 2-a, G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 220—226.

HARINA N. P. — Despre creşterea sensibilităţii reacţiei serologice de aglutinare în tuburi de bruceloză, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1960, nr. 9, p. 109—113; din *Probl. de Pat. inf. din literatura sovietică de specialitate*, 1961, nr. 1, p. 88—95, Acad. R.P.R.—I.S.R.S.

JUKOV-VEREJNIKOV N. N. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, Ed. de Stat pentru lit. ştiinţ., Bucureşti, 1952 (traducere din limba rusă), p. 382—402.

JANBON M., BERTRAND L., QUATREFAGES H. — L'adénoculture, méthode rapide et fidèle du diagnostic de la brucellose aiguë, *Presse med.*, 1950, p. 1 335—56.

KHAIKINA B. G. — Asupra detectării antigenului microbian în singele bolnavilor de bruceloză, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1958, nr. 5, p. 56—61.

KARINA N. P. — Modificare a reacţiei opsonocitofagice pentru bruceloză, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1961, nr. 11, p. 30—32.

MACKIE T. J., MC CARTNEY E. J. — Handbook of practical bacteriology, ediţia a 9-a, Livingstone, Londra, 1956, p. 483—500.

MEYER E. MARGARET, MORGAN W. J. B. — Metabolic characterization of Brucella strains that show conflicting identity by biochemical and serological methods, *Bull. O.M.S.*, 1962, nr. 26, p. 823—827.

MIKHAILOV B. YA., ROZHKOV G. J. şi TAMARIN A. L. — Diagnosticul rapid şi detectarea *B. anthracis*, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)* 1960, nr. 11, p. 10—14.

MIKHOV A. P. — Reacţia de precipitare ca metodă de diagnostic rapid în bruceloză, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1961, nr. 2, p. 95—100.

NESTORESCU N., DIMITRIU OFELIA — Bacteriologie medicală (sub. red. prof. N. Nestorescu şi colab.), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 625—638.

POBEREZKIN M. N. — Reacţii pentru bruceloză pozitive la persoane fără manifestări clinice, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1959, nr. 6, p. 104—110.

POP AL., ISAC B. — Bruceloza umană, Ed. medicală, Bucureşti, 1954.

POP AL., DIMITRIU OFELIA, VASILESCU T. — Epidemiologia şi diagnosticul de laborator al brucelozei umane, Zoonoze, Ed. Soc. Şt. Med., R.P.R., 1960, p. 55.

POP AL., DIMITRIU OFELIA, VASILESCU T., ROTMAN EL. — Testul antiglobulinic ca metodă de diagnostic în bruceloza umană cronică şi latentă, *Microbiologia (Bucureşti)*, 1956, nr. 2, p. 61—67.

POPOVICI MARCELA — Bacteriologie medicală (sub red. prof. N. Nestorescu şi colab.), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 599—608 ; p. 616—623.

POSZGI N. — Bacteriologie medicală (sub redacţia prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 644—657.

SANFORD E. — Din „Bacterial and mycotic infections of man", Dubos R. J., ediţia a 2-a, Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 488—500.

SINAI G. IA. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase Ed. de Stat pentru lit. ştiinţ., Bucureşti, 1956, p. 402—410.

SUZDALTSEV A. N., POBEREZKIN M. N. — Semnificaţia orientării epidemiologice în diagnosticul brucelozei, *Ž. Microbiol. (Mosk)*., 1957, nr. 3, p. 37—39.

STABLEFORTH G. E. — The standardization of brucellosis diagnostic by sero-agglutination test, *Bull. Off. int. Epiz.*, 1950, vol. 34, p. 229—247.

STAMATIN N. — Microbiologie veterinară, Ed. agro-silvică, Bucureşti, 1957, p. 615—624.

TAGA M., GRIGORE G., CIOMÎRŢAN C. — Reacţia inelară în diagnosticul brucelozei la vacile de lapte, *Ann. Inst. pal. şi ig. animală*, Bucureşti, 1950, vol. II, p. 109—115.

TOPLEY AND WILSON'S — Principles of Bacteriology and Immunity, ediţia a 4-a, Ed. Edward Arnold, Londra, 1955.

TRILENKO P. A. — Controlul reacţiei inelare pentru diagnosticul brucelozei, *Veterinaria*, 1951, nr. 8, p. 482—483.

VERŞILOVA P. A., OSTROVSKAIA N.N. — Despre clasificarea brucelelor, *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1960, nr. 9, p. 101—105, din *Probl. de pat. inf. din literatura sovietică de specialitate*, 1961, nr. 1, p. 69—80, Acad. R.P.R., Inst. Stud. rom.-sov.

VOICULESCU M. — Aspectele clinice şi terapeutice ale brucelozei în R.P.R., Zoonoze, Ed. Soc. ştiinţ. med. R.P.R., 1960, p. 69.

ZDRODOVSKI P. F. — Bruceloza, Medghiz, Moscova, 1953.

ZDRODOVSKI P. F. — Problema reactivităţii în studiul infecţiei şi imunităţii, Traducere I.R.S., Bucureşti, 1952.

ZINSSER H. — Textbook of Bacteriology, ediţia a 11-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New-York, 1957, p. 470—477 ; 438—447 ; 448—469.

BACTERII DE IMPORTANŢĂ SECUNDARĂ PENTRU PATOLOGIA INFECŢIOASĂ UMANĂ

Cîteva genuri şi specii de bacterii la limita între parazitismul comensal şi patogenitate se întîlnesc mai puţin frecvent în infecţiile umane, iar pentru o parte din ele rolul lor patogen nu este complet lămurit.

Bacteriile din genul *Lactobacillus* sînt reprezentate de numeroase specii microaerofile şi anaerobe, care se caracterizează prin forma bacilară, lipsă de mobilitate, lipsă de spori şi fermentarea carbohidraţilor, cu producere abundentă şi obligatorie de acid lactic. Aceste bacterii prezintă interes, pentru că sînt incriminate în etiologia cariilor dentare *L. odontoliticus*, pentru că se găsesc în flora normală a intestinului nou-născutului, *L. bifidus*, a stomacului, sub denumirea de bacili Boas-Opler şi a florei vaginale sub denumirea de bacili Döderlein.

Lactobacillus bulgaricus se întîlneşte frecvent în lapte şi este folosit în industria laptelui pentru prepararea iaurtului, kefirului şi a altor preparate de lapte.

Alcaligenes faecalis este, de asemenea, un parazit comensal, morfologic similar cu bacilul tific, şi dizenteric Gram-negativ, dar care nu fermentează nici un zahăr şi astfel poate fi uşor diferenţiat de enterobacteriacee. Rolul său patogen nu este binecunoscut; a fost izolat în cazuri de septicemii, meningite acute şi piurii la copii.

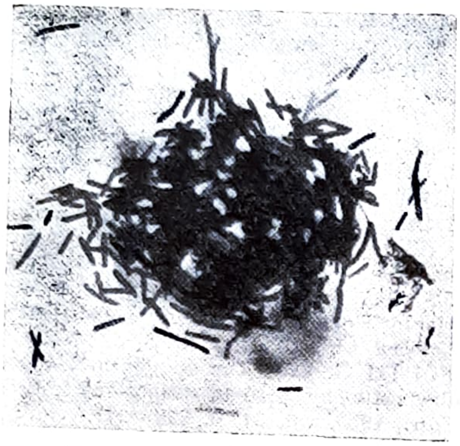


Fig. 365. — Erysipelothrix rhusiopathiae. Frotiu prin amprentă de organ de la porumbel infectat experimental.

Chromobacterium violaceum se caracterizează prin producerea unui pigment violet, solubil în alcool şi insolubil în cloroform; este Gram-negativ, mobil şi lichefiază gelatina. Se întîlneşte în mod obişnuit în sol şi apă; la om, în asociaţie sau singur, produce abcese.

Listeria monocytogenes, parazit al animalelor şi insectelor, poate produce accidental la om, şi mai ales la copii, meningoencefalite şi septicopiemii. A fost găsit şi în exsudatul faringian la bolnavii de mononucleoză infecţioasă, fără să i se fi putut dovedi rolul ca agent etiologic în această infecţie.

Se prezintă în produsul patologic sub formă de bacili subţiri, de 1—2 μ, cu aspect uneori cocoid sau difteroid, nesporulat, Gram-pozitiv şi mobil. Se izolează uşor pe geloză-ser sau pe geloză-sînge, dînd colonii mici, de 1 mm diametru, înconjurate de o zonă discretă de hemoliză. Pe geloza cu subacetat de plumb nu înnegreşte mediul şi astfel ne ajută la diferenţierea de bacilul rujetului, *Erysypelotrix rhusiopathiae.*

În infecţia experimentală este patogen pe cale intravenoasă la iepure şi intraperitoneală la şoarece şi provoacă moartea în 3—7 zile. La nivelul splinei şi ficatului animalelor moarte de infecţie experimentală se întîlnesc noduli necrotici, în care se găseşte *Listeria.* Inocularea subcutanată la iepure este urmată de apariţia unei mononucleoze sanguine care a dus la denumirea microbului, *L. monocytogenes.*

Erysypelothrix rhusiopathiae. Este un parazit comensal al porcului, al păsărilor, peştilor, crustaceelor şi insectelor. Determină la porc o boală infecţioasă, contagioasă, rujetul, de unde şi denumirea de bacilul rujetului.

La om provoacă infecţii accidentale şi îmbracă un caracter profesional, întîlnindu-se, de predilecţie, la cei care vin în contact cu carnea de porc: măcelari, muncitori de abatoare, medici şi personalul sanitar veterinar. Contaminarea se face prin soluţie de continuitate cutanată, excepţional prin ingestie. Din punct de vedere clinic, se întîlnesc 3 forme la om: forma cutanată benignă sau erizipeloidul Rosenbach, forma cutanată gravă, însoţită de manifestări ganglionare şi limfangită, forma septicemică, extrem de rară. Diagnosticul de laborator în formele cutanate este dificil de realizat, pentru că însămînţarea serozităţii din leziuni nu dă rezultate şi este necesar să se grefeze un fragment din leziunea cutanată în muşchii pectorali ai unui porumbel, ceea ce în practica medicală umană nu este realizabil. În cazurile septicemice, excepţionale, se foloseşte hemocultura pe bulion glucozat $5^{0}/_{00}$ cu ascită sau ser. Morfologic şi tinctorial se aseamănă cu *L. monocytogenes* şi se diferenţiază prin caracterele biochimice.

La infecţia experimentală, cu cultură, sînt foarte sensibili şoarecele şi porumbelul; cobaiul şi iepurele, refractari pe cale subcutanată, pot fi infectaţi numai pe cale intravenoasă. De la animalele infectate microbul se izolează cu uşurinţă prin hemocultură.

Streptobacilus moniliformis, descoperit de acad. S. Nicolau şi Poincloux, este astăzi considerat identic cu *Haverhillia multiformis*, izolat de Parker cu ocazia unei epidemii de *Erithema artriticum* în localitatea Haverhill, din S. U. A. Este un microb Gram-negativ, sub formă de bacili scurţi, pleomorfi, nesporulaţi, lipsiţi de capsulă şi imobili. Se dezvoltă în condiţii de microaerofilie în prezenţa sîngelui sau ascitei în mediul de cultură.

Microbul este încă neclasificat definitiv pînă azi; Bergey îl consideră apropiat genului *Haemophilus;* este un parazit comensal al cavității bucale a șobolanului. Omul se contaminează prin mușcătura șobolanului sau prin consumarea laptelui contaminat de șobolani. Infecția la om este o stare febrilă asemănătoare cu cea dată de *Spirillum minus*, alt parazit comensal al cavității bucale a șobolanului, febra mușcăturii de șobolan. Șoarecele este sensibil la infecția experimentală cu *Streptobacillus moniliformis*.

Streptobacillus moniliformis are o importanță teoretică generală în microbiologie, pentru că este foarte înrudit cu formele filtrabile ale microorganismelor, denumite forme *L.*, al căror rol în patologie și epidemiologie este încă neelucidat.

TABELUL 133

Caracterele diferențiale între *Erysipelothrix rhusiopathiae* și *Listeria monocytogenes*

	Lapte turnesolat (acidifiere)	Geloză subacetat de Pb (înnegrire)	Geloză cu esculină (înnegrire)	Putere patogenă experimentală				Seroaglutinare	
				Iepure	Porumbel	Șoarece	Cobai (cale conjunctivală)	*E. rhusiopathiae*	*L. monocytogenes*
Erysypelotrix rhusiopathiae	–	+	–	+	+	+	–	+	–
Listeria monocytogenes	+	–	+	Cale subcutanată = mononucleoză Cale intravenoasă = noduli necrotici în ficat și splină Cale conjunctivală = conjunctivită purulentă	–	+	+	–	+

BIBLIOGRAFIE

BUNAEVA T. N. — Un model nou de investigație biologică în listerioze, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1961, nr. 9, p. 51—56.

DUMAS J. — Bactériologie médicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 477—483.

FULGA C., CONSTANTINESCU N. — Meningita purulentă cu *Listeria monocytogenes*, *Microbiologia* (*București*), 1962, nr. 6, p. 519—520.

GAIGINSCHI ALEXANDRINA — Bacteriologie medicală (sub. red. prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, București, 1961, p. 639—643.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 573.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 240—242.

MACKIE T. J., MC CARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 395—396, 467—468, 531—532.

REED R. W. — Bacterial and mycotic infections of man editat de Dubos R., ed. a 3-a, Ed. Pitman, Londra 1958, p. 453—462.

ROȘCA V., MIRONESCU D., ROMANO M. — Listerioza, o nouă zoonoză pe teritoriul țării noastre, *Microbiologia* (*București*), 1960, nr. 5, p. 429—438.

ROȘCA V. — Studiu epizootologic și epidemiologic privind interdependența unor focare de listerioză constatate la diferite specii de animale și om, *Microbiologia* (*București*), 1962, nr. 6, p. 521—534.

STAMATIN N. — Microbiologia veterinară, Ed. Agrosilvică, București, 1957, p. 389—400, 414—426, 428—429.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Editura G. Thieme, Leipzig, 1959, partea I, p. 557—574.

ZINSSER H. — Textbook of bacteriology, ed. a 11-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New-York, 1957, p. 505—520.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE MICROBII ANAEROBI

Generalități

Concepțiile despre aerobioză și anaerobioză la bacterii au fost revizuite de cercetările din ultimii ani și noțiunea clasică după care oxigenul molecular, atmosferic, ar fi toxic pentru microbii strict anaerobi trebuie privită azi ca un fenomen mai complex.

În realitate, metabolismul oricărei celule bacteriene cuprinde, pe de o parte, reacții de degradare a substratului nutritiv, reacții catabolice, producătoare de energie și pe de altă parte, reacții de sinteză a materiei vii, reacții anabolice, consumatoare de energie.

Desfășurarea acestor reacții se efectuează datorită echipamentului enzimatic celular, a cărui activitate este condiționată de anumite caracteristici fizico-chimice ale mediului, printre care de primă importanță sînt valorile pH și rH.

Noţiunea convenţională de pH reprezintă logaritmul inversat al concentraţiei hidrogenionilor liberi din mediu.

Noţiunea de rH, potenţialul de oxidoreducere, reprezintă logaritmul inversat al tensiunii de hidrogen din mediu.

După concepţia lui Clark, într-un mediu cu un anumit pH, care conţine proporţii variabile de produşi oxidanţi „PO'' şi de produşi reductori „PR'', se poate caracteriza valoarea proporţiei PO/PR prin intermediul noţiunii convenţionale de rH, care exprimă tensiunea hidrogenului din soluţie şi oglindeşte puterea şi intensitatea sistemului reductor. Bacteriile strict aerobe nu se pot dezvolta decît într-un mediu cu un rH de valori ridicate, adică cu o tensiune mare de oxigen. Bacteriile strict anaerobe se pot dezvolta numai într-un mediu cu un rH de valori scăzute; cu alte cuvinte, într-o tensiune scăzută de oxigen sau într-o concentraţie ridicată de substanţe reductoare.

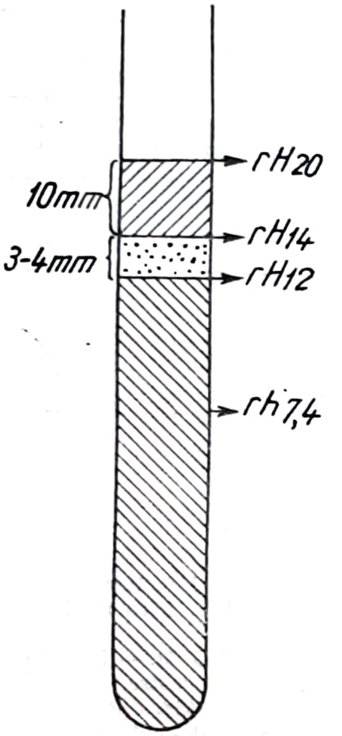


Fig. 366. — Zonele de creştere a anaerobilor în tubul Weinberg.

Anaerobii facultativ sau bacteriile microaerofile posedă un echipament enzimatic complex care le permite creşterea şi înmulţirea în medii cu valori de rH cu limite destul de largi.

Măsurarea rH se face, ca şi la pH, prin metode colorimetrice sau electrometrice. Convenţional $rH = 0$ corespunde tensiunii oxigenului din aerul atmosferic. Oxigenul pur la aceeaşi presiune corespunde la $rH = 41$. Scara convenţională astfel stabilită are ca valoare medie $rH = 20,5$, în care se realizează un mediu echilibrat, nici oxidant, nici reductor.

Aplicarea practică a consideraţiilor teoretice de mai sus se poate face descriind valorile rH într-un mediu de cultură curent, folosit în tehnicile anaerobe de microbiologie, ca de pildă geloza glucozată Veillon.

Acest mediu, aşezat în tuburi lungi şi înguste de tip Weinberg, prezintă 3 zone importante de creştere:

a) zona superficială, aerobă, în care se dezvoltă bine bacteriile aerobe şi coboară pînă la 10 mm în coloana de geloză. Valorile rH variază de la 20 la suprafaţă, la 14, aproximativ la 10 mm adîncime;

b) zona intermediară, cu o grosime de 3—4 mm, în care se pot dezvolta bacteriile microaerofile, corespunde la valori de $rH = 12-14$;

c) zona anaerobă strictă, care cuprinde 8/10 din coloana de geloză şi corespunde la valori sub $rH = 12$.

Activitatea metabolică a bacteriilor în anaerobioză determină numai descompuneri parţiale ale substanţelor organice din mediu şi substratul nutritiv nu este oxidat pînă la stadiile terminale de CO_2 şi H_2O. Această fragmentare a substratului prin fenomene de oxidoreducere reprezintă procesul de fermentaţie a substanţelor organice. Reacţiile de fermentaţie sînt totdeauna slabe producătoare de energie; 1 g de glucoză descompusă prin fermentaţie nu furnizează decît 0,1—0,2 calorii, pe cîtă vreme aceeaşi cantitate de glucoză degradată de un microb aerob produce 4,1 calorii. Rezultă, din această constatare, că pentru a obţine energia necesară vieţii anaerobe sînt necesare cantităţi mari de substrat nutritiv. Astfel se pot explica distrugerile importante de ţesut şi tendinţa rapidă la extensie a leziunilor, care se manifestă în cazul infecţiei cu asociaţia de bacterii anaerobe care produc gangrena gazoasă.

Metodele de cultură a bacteriilor anaerobe

Toate metodele folosite au drept scop scăderea rH. Ele pot fi împărţite în fizice, chimice şi biologice.

Dintre *metodele fizice*, cea mai folosită este eliminarea aerului prin fierbere. Ea constă în introducerea mediului de cultură, timp de 30 de minute, într-o baie de apă la 100° sau într-un autoclav deschis. După acest interval, în care oxigenul dizolvat din mediu este eliminat, dacă mediul este lichid, se răceşte repede la robinet şi se însămînţează; dacă mediul este solid sau semisolid se răceşte într-o baie de 50°, se însămînţează şi după însămînţare se răceşte rapid la robinet, pentru solidificare.

Pentru mediile cu suprafaţa mare de contact (plăci Petri) se realizează anaerobioza plasînd plăcile într-un exsicator închis ermetic, prin a cărui tubulură cu robinet se extrage aerul cu o trompă sau pompă de vid, după care se închide etanş robinetul.

Metodele chimice se bazează pe adăugarea, în compoziţia mediului, a unor substanţe chimice cu acţiune puternic reductoare, cum sînt glucoza, cisteina, glutationul, acidul ascorbic etc.

Pe baza cercetărilor din ultimul timp ale lui Van Euler şi Martins, care au reuşit să sintetizeze un produs chimic cu o deosebită putere reductoare, s-a simplificat mult cultura bacteriilor anaerobe. Acest produs, un dienol al aldehidei tartronice sau „reductonă", este deosebit de activ şi este suficient să adăugăm la un tub de bulion 1 ml dintr-o soluţie 2,5% reductonă în apă distilată, pentru a obţine, în interval de 1 oră, o scădere a rH în jurul a 5,4—5,8, deci la o limită inferioară valorilor minime de creştere necesare bacteriilor strict anaerobe.

Brewer a obţinut rezultate asemănătoare cu tioglicolatul de Na. Mediul Brewer cu adaos de tioglicolat a fost adaptat oficial în S. U. A. pentru controlul prezenţei anaerobilor în produsele biologice. Schaub şi Foley recomandă folosirea mediului Brewer în laboratorul clinic.

Metodele biologice realizează anaerobioza, fie prin cultivarea simultană a unei bacterii aerobe puternic consumatoare de oxigen, cum este *B. subtilis* sau *B. prodigiosus*, într-un vas ermetic închis, fie mai frecvent, prin adăugarea în mediul nutritiv a unor fragmente de ţesuturi animale (mediul Tarozzi), vegetale sau chiar corpuri inerte, ca ipsos sau cărbune, care posedă o acţiune absorbantă faţă de oxigenul dizolvat în mediu.

O dată oxigenul dizolvat eliminat din mediul de cultură printr-unul din procedeele descrise mai sus, trebuie să ţinem seama de menţinerea anaerobiozei realizate în mediu prin izolarea lui de exterior; aceasta se realizează cu ajutorul unui strat protector de ulei de vaselină sau parafină, steril, pentru mediile lichide, sau prin adăugarea — la mediile solide — de substanţe ca glucoza 1%, care are dublul avantaj de a fi, pe de o parte, substrat energetic, iar pe de altă parte, prin acţiunea sa reductoare menţine rH la valorile scăzute necesare creşterii anaerobe.

În funcţie de caracteristicile speciei microbiene pe care vrem s-o cultivăm, vom prevedea în compoziţia mediului anaerob factorii de creştere necesari: ser pentru proteine complexe sînge pentru hemofilii obligatori, vitamine etc. Este bine să folosim acidul ascorbic în proporţie de 1/5 000—1/10 000, pentru că acţionează atît ca factor de creştere, cît şi ca substanţă reductoare.

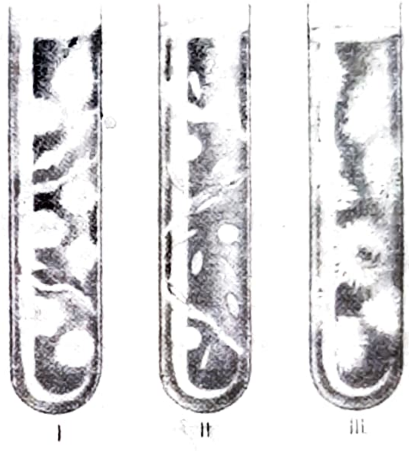


Fig. 367. — Creşterea bacililor anaerobi în geloză Veillon: I şi III — colonii difuze date de *Cl. tetani* şi *Cl. hystoliticum*; *II* — colonii lenticulare de *Cl. perfringens*.

Clasificarea bacteriilor anaerobe

După originea anaerobilor, Veillon i-a împărţit în 2 mari categorii:

Anaerobii telurici, care trăiesc în sol, unde rezistă datorită sporilor. În general sînt microbi care se cultivă uşor, lichefiază gelatina şi sînt Gram-pozitiv.

Unii dintre ei au importanţă pentru patologia umană, prin faptul că secretă o exotoxină puternică, difuzibilă, cu tropism marcat pentru sistemul nervos (*Cl. tetani* şi *Cl. botulinum*).

Alţii determină gangrena gazoasă, gangrenele chirurgicale, datorită puterii proteolitice, hemolitice şi necrotice a toxinelor pe care le secretă (*Cl. septicum*, *Cl. oedematiens*, *Cl. histolyticum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. fallax*, *Cl. perfringens* etc.).

Anaerobii netelurici sînt bacterii care trăiesc în stare de parazitism comensal, în cavităţile naturale ale omului şi animalelor. La om, la nivelul amigdalelor, cariilor şi tartrului dentar, mucoaselor genitale şi anale, în apendice etc.

Spre deosebire de anaerobii telurici, aceştia sînt fragili, nesporulaţi, foarte greu cultivabili, nu lichefiază gelatina şi în general sînt Gram-negativ.

Manifestările lor patologice, foarte variate, sînt reprezentate de septicemii după amigdalectomii sau extracții dentare, infecții de focar mono- sau polimicrobiene, focare fetide gangrenoase ale tubului digestiv, apendice, căi urinare și genitale, pleură, peritoneu etc.

Printre cei mai importanți microbi din această categorie de anaerobi enumerăm : *Spherofilus funduliformis*, *Ristella fragilis*, *Ramibacterium ramosum*, *Fusiformis fusiformis*, stafilococi și streptococi anaerobi.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TOXIINFECȚIEI TETANICE

Familia : *Bacillaceae.* Genul : *Clostridium.* Specia tip : *Clostridium tetani.*

Generalități

Tetanosul este o toxiinfecție acută, care se întîlnește la om și numeroase specii animale, în urma infectării unei plăgi cu spori tetanici.

Bacilul tetanic, agentul patogen al tetanosului este un microorganism în formă de bastonaș și are la unul din capete un spor terminal, care îi dă aspectul de ac cu gămălie. Este mobil, posedă cili peritrichi, nu este capsulat, este Gram-pozitiv în culturi tinere și pierde colorația Gram în culturile vechi. Sporul tînăr se colorează și cu coloranții uzuali. Sporul matur se colorează greu numai cu metode speciale, spre exemplu metoda Pooman, Möller sau verde malahit.

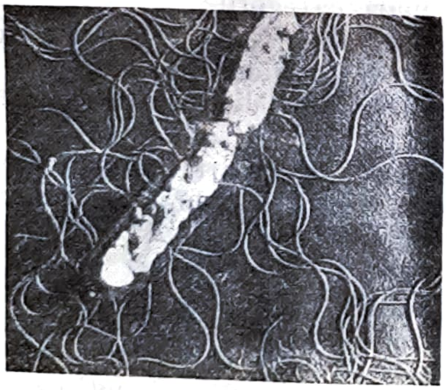


Fig. 368. — Clostridium tetani. Imagine electronică × 12 000. Se vede inserția citoplasmatică a cililor (adaptată din F. Scanga).

Se dezvoltă pe toate mediile de cultură uzuale, în strictă anaerobioză. Tulbură bulionul, producînd gaze cu miros de corn ars și depozit abundent sub formă de flocoane. Pe geloză moale, bacilii tetanici ciliați dau colonii sferice, cu centrul compact și periferia difuză, colonii pufoase sau difuze „D". Bacilii neciliați dau colonii bine dezvoltate, sferice, lenticulare „L". Însămînțați prin înțepătură în gelatină, cultivă sub forma unui brad inversat.

Strict anaerob, se dezvoltă optim la temperatura de 37° și pH 7,4—7,8. Nu fermentează nici un zahăr. Are acțiune proteolitică slabă. Pe geloză-sînge produce hemoliză. Produce indol. În lapte se dezvoltă slab, determinînd rar coagularea lui. Produce hidrogen sulfurat. Cultivat cu microbi aerobi, care consumă oxigenul, se poate dezvolta și în prezența oxigenului atmosferic.

Bacilul tetanic rezistă la agenți fizici și chimici datorită prezenței sporului. Numai sterilizarea timp de 30 de minute la 120° căldură umedă (autoclavare) poate distruge sporii.

Sporii tetanici sînt foarte răspîndiți în natură în special în pămînt, în conținutul intestinal al animalelor ierbivore și al omului. Contaminarea solului este în raport cu poluarea lui cu conținut intestinal.

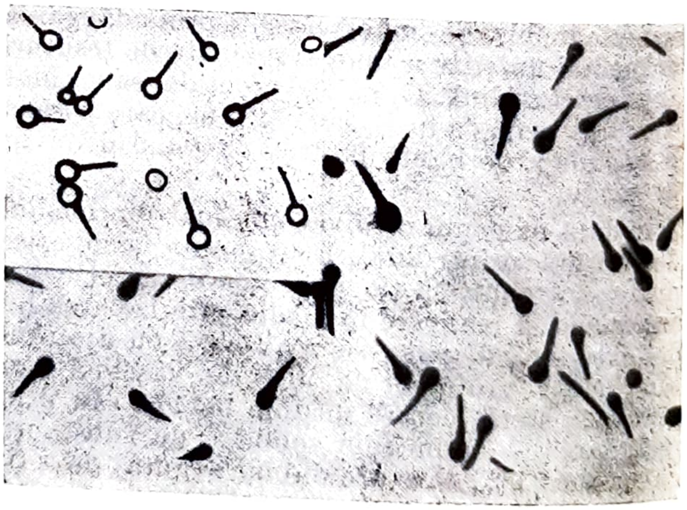


Fig. 369. — Clostridium tetani. Frotiu de cultură. Se observă forme caracteristice de bacil cu spor terminal (colorație Gram).

Patogenitate la om

În condiţii de infecţie naturală, tetanosul se datoreşte contaminării unei plăgi cu spori tetanici. Însă nu orice plagă contaminată cu spori tetanici produce tetanosul. Anumite condiţii favorizante trebuie îndeplinite pentru ca germinaţia sporilor să aibă loc: traumatism local, hemoragie, hematom, fractură, distrugerea mare de ţesuturi, prezenţa cheagurilor şi a corpilor străini, frigul, căldura exagerată ca şi asociaţiile microbiene realizează condiţii favorabile pentru izbucnirea tetanosului.

În asemenea condiţii, sporii cantonaţi la poarta de intrare germinează, se dezvoltă, se transformă în bacili ce elaborează exotoxina tetanică, care difuzează în organism pe cale sanguină sau de-a lungul cilindrului-ax ajungînd la sistemul nervos central, unde afectează nucleii motori.

Boala la om este caracterizată prin două simptome importante: o stare de contractură musculară permanentă — rigiditate musculară — şi o excitabilitate mărită, care provoacă accese de contracturi trecătoare.

Toxinogeneza. Simptomele caracteristice ale tetanosului sînt în întregime datorite unei puternice exotoxine, care poate fi pusă în evidenţă în filtratele de cultură şi prin efectele ei la animale. Filtratul culturilor de bacili tetanici conţine cel puţin două fracţiuni toxice:

Tetanolizina este o hemotoxină capabilă să lizeze hematiile şi în parte, şi leucocitele. Are o importanţă patogenică redusă; prin acţiunea hemo- şi leucolitică joacă probabil un rol în progresul infecţiei tetanice în ţesuturi.

Tetanospasmina sau tetanotoxina, o neurotoxină caracteristică, cu afinitate deosebită pentru ţesutul nervos, este una din cele mai puternice toxine bacteriene cunoscute.

Prepararea şi titrarea toxinei tetanice. Toxina tetanică este preparată pe medii lichide în anaerobioză. Bacilul tetanic se cultivă pe bulion preparat din carne de viţel, peptonat şi glucozat, timp de 6—7 zile la 37°. Bulionul se filtrează apoi prin filtru Seitz şi se obţine exotoxina.

Titrarea toxinei tetanice se poate face *in vitro* sau *in vivo*. Titrarea *in vitro* se face prin metoda floculării, prin comparaţie cu un ser antitetanic cu titru cunoscut. Se stabileşte astfel valoarea antigenică a toxinei prin determinarea „limitei floculante'' (Lf). Titrarea ***in vivo*** se face pe şoareci albi. Din toxina brută se fac diluţii din care se inoculează cîte un şoarece, subcutanat, la coapsă. Se determină astfel valoarea toxică a toxinei tetanice prin stabilirea dozei limite mortale (D.L.M.). Cantitatea minimă de toxină care omoară şoarecele în 4 zile, cu fenomene tipice de intoxicare tetanică = 1 D.L.M.

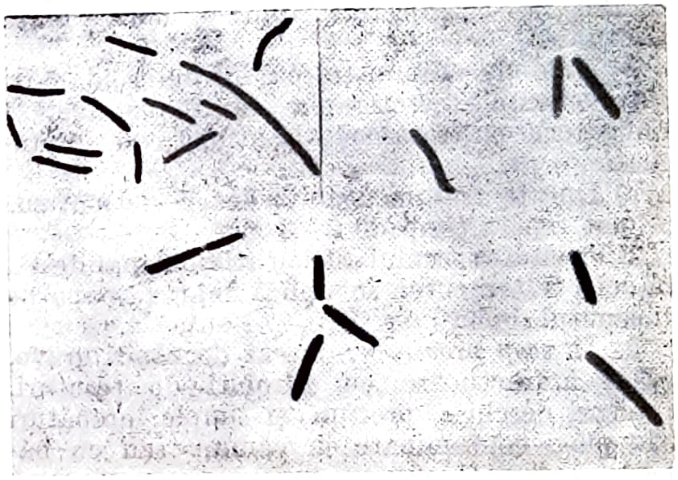


Fig. 370. — Clostridium tetani. Frotiu de cultură în bulion anaerob. Se văd bacili nesporulaţi (coloraţie Gram).

Prepararea anatoxinei tetanice. Din toxine tetanice cu cel puţin 1 000 D. L. M. sau cu un titru floculant minim de 8 Lf pe ml, prin formolare $4^0/_{00}$ şi menţinerea la 39—40° timp de 3—4 săptămîni, se prepară anatoxina tetanică sau formoltoxoidul tetanic, cu proprietăţi antigenice ridicate.

Patogenitate la animale

Tetanosul poate fi reprodus experimental prin inocularea la animalele de laborator a unei cantităţi de cultură pură sau chiar numai de toxină. Şoarecele alb, şobolanul, cobaiul, iepurele, maimuţa şi calul sînt printre speciile cele mai sensibile. Sensibilitatea la toxina tetanică se manifestă prin apariţia de paralizii ale membrelor, care apoi se generalizează, realizînd tetanosul experimental.

Imunitate

Se poate conferi imunitatea activă antitoxică la om şi animale prin inoculări repetate de anatoxină tetanică. Se poate conferi o imunitate artificială pasivă prin injectarea serului antitetanic de la animale imunizate.

Serul antitetanic este un ser antitoxic, care provine din sîngele cailor hiperimunizaţi cu anatoxină tetanică. Se foloseşte în tratamentul curativ şi preventiv al toxiinfecţiei tetanice.

1. În *scop terapeutic* se administrează astfel:

a) Doze: 200 000—500 000 U.A.I.; este preferabil să se injecteze dintr-o dată toată cantitatea.

b) Cale de administrare: intramusculară şi intravenoasă. Seroterapia va fi completată obligatoriu cu tratamentul antibiotic şi simptomatic.

c) Durata tratamentului: dozele de mai sus se pot repeta timp de 2—3 zile.

Eficacitatea serului este cu atît mai manifestă, cu cît tratamentul se aplică mai aproape de începutul bolii.

2. În *scop preventiv:* în caz de răniri grave, plăgi anfractuoase cu zdrobiri de ţesuturi, fracturi deschise, precum şi simple înţepături sau plăgi contaminate cu pămînt sau cu bălegar, se va face:

a) o imunizare activă cu anatoxină tetanică;

b) concomitent, dar în altă regiune a corpului, se va administra ser antitetanic în scop preventiv (1 500 — 3 000 U.A.I.).

Calea de administrare: subcutanată.

Durata tratamentului: doza de mai sus se repetă eventual după 5 — 6 zile.

Tratamentul chirurgical al plăgii şi profilaxia cu antibiotice sînt obligatorii.

Imunitatea conferită prin ser durează 2 —3 săptămîni.

Serurile antitetanice, livrate în ţara noastră de Institutul „Dr. I. Cantacuzino", sînt seruri native de la cai imunizaţi activ.

Serurile imune nu vor fi administrate la bolnavi, decît după ce s-a făcut cercetarea sensibilităţii alergice a bolnavului faţă de serul de cal. În caz de hipersensibilitate, se va face o desensibilizare şi numai apoi se va putea administra doza terapeutică de ser.

Cercetarea stării de sensibilitate a bolnavului faţă de serul de cal. *a)* Prin anamneză: trebuie bănuită o hipersensibilitate la toate persoanele cu manifestări alergice: astm bronşic, rinită spasmodică, eczeme, urticarii, alergii alimentare şi cutanate şi mai ales la persoanele care au mai primit, cu săptămîni sau chiar ani în urmă, ser de cal antidifteric, antitetanic etc.

b) Prin teste de sensibilitate: se utilizează de obicei următoarele 3 teste: testul conjunctival, testul cutanat şi testul intradermic. Ele vor fi practicate astfel: dacă se bănuieşte o hipersensibilitate, testele se practică cu o diluţie de ser de 1/10. În cazul în care din datele anamnestice se bănuieşte o hipersensibilitate însemnată, testele vor fi practicate cu o diluţie de 1/100 în ser fiziologic steril sau chiar 1/1 000 — 1/10 000.

1. Testul conjunctival nu se practică la copii, deoarece plîng şi se freacă la ochi, sau la bolnavii cu afecţiuni oculare. Se depune pe conjunctivă o picătură din diluţia de ser terapeutic. Reacţia se citeşte după o jumătate de oră: în caz de hipersensibilitate apare o congestie conjunctivală, uneori însoţită de lăcrimare abundentă şi chemozis.

2. Testul cutanat: se depune, pe pielea în prealabil dezinfectată cu eter sau alcool, o picătură din diluţia de ser terapeutic şi, cu vîrful unui ac steril, se fac 2 — 3 scarificări superficiale prin picătură de ser. Reacţia se citeşte după o jumătate de oră; în caz de hipersensibilitate apare o congestie locală mai mult sau mai puţin întinsă, de 2 — 5 mm în jurul liniilor de scarificare.

3. Testul intradermic: se injectează strict intradermic 0,1 ml din diluţia de ser terapeutic. Reacţia se citeşte după o jumătate de oră. În caz de hipersensibilitate apare o congestie locală de 5 — 10 mm, eventual cu edem. În reacţiile foarte intense, zona eritemopapulară se poate întinde la cîţiva cm, conturul prezintă prelungiri în diferite sensuri şi pot apărea şi fenomene generale: congestie, hipotensiune, lipotimie.

Desensibilizarea. Se va începe cu diluţia care în doză de 0,1 ml nu a produs decît o uşoară reacţie locală şi se va injecta pe cale subcutanată, din jumătate în jumătate de oră, sub control medical strict, cîte 0,2; 0,4; 0,6 ml, după care se va trece la administrarea restului de ser necesar dozei terapeutice stabilite.

În caz de accidente anafilactice, se va întrerupe injectarea şi se va aplica tratamentul potrivit: efedrină, adrenalină sau noradrenalină, antihistaminice, cortizon etc.

Ser nativ 50 — 100 ml, restul necesar dozei terapeutice. Este la latitudinea medicului de a modifica această schemă, fie scurtînd-o, fie prelungind-o, în funcţie de modul de reacţie a bolnavului.

Exemple de desensibilizare prin injecții subcutanate

Diluții	Cantitate (ml)	Interval între injecții
1/100	0,2	1/2 oră
1/100	0,4	1/2 „
1/100	0,6	1/2 „
1/10	0,2	1/2 „
1/10	0,4	1/2 „
1/10	0,6	1/2 „
Ser nativ	0,2	1/2 „
„ „	0,4	1/2 „
„ „	0,6	1/2 „
„ „	1,0	1/2 „
		Total · · · 5 ore

Desensibilizarea poate preveni numai accidentele imediate, dar nu pe cele tardive, cum este boala serului. Administrarea de antihistaminice de tip fenergan și de hormoni de tipul cortizonului, timp mai îndelungat, poate, într-o oarecare măsură, preveni sau atenua accidentele imediate și boala serului.

Accidentele imediate pot fi de două feluri:

a) **Șocul nespecific**, de tip peptonă sau proteină străină, cu frison, febră, congestia feței, inversarea formulei leucocitare și scăderea coagulabilității sîngelui, care sînt trecătoare și nu periclitează viața bolnavului.

b) **Șocul anafilactic**, specific de hipersensibilitate, asemănător unei injecții de histamină, cu prăbușirea tensiunii, colaps, vărsături, emisiuni spontane de urină și fecale, crize astmatiforme și moarte.

Tratamentul va consta din administrarea de vasoconstrictoare simpaticomimetice, adrenalină, efedrină, noradrenalină, dezoxicorticosteron, parasimpaticolitice, antihistaminice și eventual, plasmă sau înlocuitoare de plasmă și oxigenoterapie.

Fenomenele tardive locale, ca fenomenul Arthus și generale, ca boala serului, cu febră, erupții, adenopatii, artralgii, albuminurie etc. apar de obicei după cîteva zile. După 12 – 14 zile, dacă bolnavul nu a mai primit ser, sau după o incubație scurtă, de 8 – 6 – 4 și chiar mai puține zile, în funcție de sensibilizarea anterioară a bolnavului față de ser.

Aceste accidente, uneori foarte dramatice și supărătoare, de obicei nu pun, prin ele însele, viața bolnavului în pericol, dar pot agrava o boală preexistentă.

Boala serului este în special îngrijorătoare în caz de astm, obstrucție laringiană, tetanos și la bolnavi care au suferințe organice grave: tuberculoză, insuficiență hepatică sau renală.

Vaccinoprofilaxia și vaccinoterapia tetanosului. Pentru imunizarea preventivă a unei colectivități expuse la plăgi tetanigene se aplică vaccinarea cu anatoxină tetanică.

Anatoxina tetanică este toxina detoxificată, care își menține intactă valoarea imunizantă. Se folosește în profilaxia și tratamentul tetanosului.

Modul de întrebuințare. a) *Profilactic*, se injectează subcutanat 1 ml, după 4 săptămîni 2 ml și după altă săptămînă 2 ml anatoxină.

Imunitatea obținută pe această cale durează cel puțin 2 ani și se poate reîntări printr-o injecție de redeșteptare după 1 – 2 ani, cu 2 ml de anatoxină.

În cazul unei răniri grave (plagă anfractuoasă cu zdrobiri de țesuturi, contaminare cu pămînt, resturi de haine etc.) la persoanele care n-au fost vaccinate, o dată cu prima injecție de anatoxină, se vor administra 1 500 unități de ser antitetanic, în altă regiune a corpului.

Se continuă injecțiile cu cîte 2 ml anatoxină la 7 – 8 zile interval, pînă la vindecarea plăgii.

La persoanele vaccinate complet se face o singură injecție, cu 2 ml anatoxină.

b) *Tratament.* Se injectează subcutanat 2 ml de anatoxină, după 5 zile 2 ml, după alte 4 zile 4 ml, după 5 zile 6 ml, doză care se repetă la 4 – 5 zile interval, pînă la vindecarea plăgii. Tratamentul cu anatoxină completează seroterapia și tratamentul chirurgical al plăgii, care sînt obligatorii. Vaccinarea cu anatoxină tetanică nu provoacă reacții locale și generale. Nu există contraindicații pentru vaccinarea cu anatoxină tetanică.

Diagnosticul de laborator

Întrucît semnele clinice caracteristice ale tetanosului sînt, în majoritatea cazurilor, suficiente pentru diagnostic, punerea în evidență a bacilului tetanic nu se face decît în scopul verificării sterilității unor obiecte cu importanță epidemiologică: pămînt, catgut, bandaje etc.

1. Materialul folosit pentru examinare: țesuturi sau puroi de la nivelul plăgilor bănuite tetanigene, porțiuni de cordon ombilical, în

tetanosul nou-născuţilor, pămînt, catgut chirurgical etc.

2. Examenul produsului poate fi făcut prin:

a) *Frotiu colorat* prin metoda Gram. Caracterele morfologice şi tinctoriale nu sînt suficiente pentru punerea diagnosticului.

b) *Însămînţarea* într-un balonaş cu bulion glucozat, fiert în prealabil timp de 10 minute, pentru a îndepărta oxigenul, apoi răcit şi acoperit cu un strat de 1 — 2 ml de ulei de parafină steril. Bulionul însămînţat se păstrează la termostat la 37°. După 3 — 5 zile se aspiră cu o pipetă sterilă 8—10 ml de bulion însămînţat şi se încălzeşte timp de 30 de minute la 70° sau 1 — 2 minute la 100°. În acest mod sînt distruse toate formele vegetative de bacili tetanici, în timp ce sporii tetanici rezistă. Pentru obţinerea coloniilor izolate se recurge la metoda diluţiilor succesive, făcute în tuburi Weinberg cu geloză 0,5%. În prealabil, tuburile se încălzesc pînă la fierbere timp de 10 minute şi sînt lăsate să se răcească pînă la 45 — 50°. Din bulion însămînţat, în care se găsesc numai microbi sporulaţi, se ia cu o pipetă Pasteur sterilă o cantitate de 0,5 — 1 ml şi se însămînţează într-un tub Weinberg, omogenizînd bine amestecul. Cu altă pipetă se ia, din primul tub însămînţat, o cantitate de mediu şi se trece în al doilea tub. Se procedează astfel, prin diluţie, pînă la însămînţarea a 4 — 6 tuburi Weinberg, schimbînd de fiecare dată pipeta Pasteur. Tuburile însămînţate se răcesc brusc la un curent de apă şi se pun la termostat la 37°. După 24 — 48 de ore, coloniile suspecte vor fi prelevate din profunzimea mediului, prin aspiraţie, cu ajutorul unei pipete Pasteur, prevăzută cu o pară de cauciuc sau prin fragmentarea coloanei de geloză într-o placă Petri sterilă. Dintr-o parte a coloniei se face frotiul, iar din rest se însămînţează într-un tub cu bulion anaerob V.F., pentru obţinerea unei culturi pure şi elaborare de toxină.

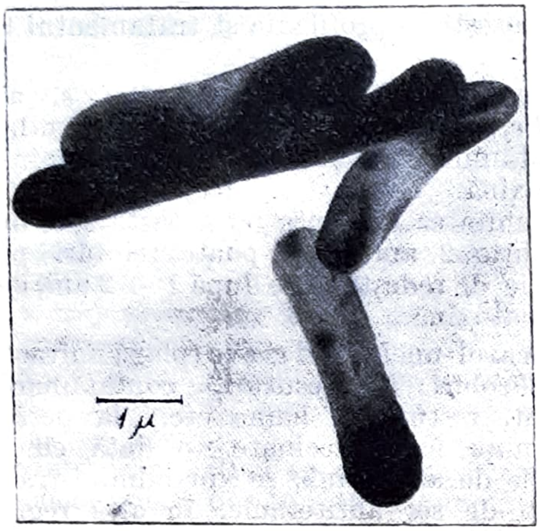


Fig. 371. — Clostridium tetani. Imagine electronică × 6 000. Se observă poziţia terminală a endosporului.

Pentru identificarea microbului astfel izolat, se va proceda la cercetarea caracterelor de cultură şi biochimice, urmate de inocularea la animale sensibile pentru identificarea toxinei.

c) *Inocularea produsului* de examinat sau a culturii făcute la animalul sensibil este cea mai bună metodă de identificare. Această etapă de diagnostic este şi obligatorie pentru deosebirea de *Cl. tetanomorphum*, anaerob identic morfologic cu *Cl. tetani*, dar care nu este patogen pentru om şi animale. În acest scop se injectează o cantitate de 0,5 ml produs sau cultură de 1—2 zile, în bulion V.F., la şoareci albi, subcutanat, în una din labele posterioare. Confirmarea diagnosticului se face prin apariţia, la animalele inoculate, a următoarelor simptome: paralizii, contracturi, convulsii provocate şi exagerate de cele mai mici excitaţii care apar la locul de inoculare şi care apoi se generalizează în tot corpul, ducînd la moartea animalului.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INTOXICAŢIEI BOTULINICE

Familia: *Bacillaceae.* Genul: *Clostridium.*
Specia tip: *Clostridium botulinum.*

Generalităţi

Botulismul este o intoxicaţie alimentară gravă, datorită ingerării de alimente care conţin exotoxina elaborată de *Cl. botulinum.*

Cl. botulinum în culturi tinere are forma unui bastonaş, cu extremităţile rotunjite; are cili peritrichi şi este mobil, prezintă un spor ovoid, cel mai deseori subterminal. Este Gram-pozitiv.

Cl. botulinum creşte anaerob pe majoritatea mediilor de cultură obişnuite. În bulion cultivă după 24 de ore, îl tulbură şi formează bule de gaz. Elaborarea toxinei este favorizată de cultivare în bulion V.F. Pe geloză, în profunzime, dă colonii sferice, pufoase şi formează bule de gaz. În gelatină formează colonii sferice şi lichefiază mediul. Toate aceste culturi răspîndesc un miros de unt rînced.

Strict anaerob, se dezvoltă la pH 7,4 — 8 şi la o temperatură de 20 — 38°, optimum 30°.

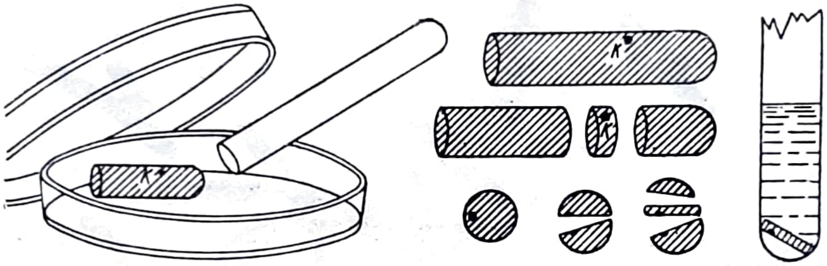


Fig. 372. — Tehnica obţinerii unei colonii izolate din profunzimea unei geloze Veillon.

Fermentează glucoza şi maltoza, cu degajare de gaz şi acid. Digeră albuşul de ou şi carnea. Nu produce indol.

Sporii bacilului botulinic sînt de o rezistenţă excepţională. Numai încălzirea la 120°, cu vapori de apă sub presiune, timp de 30 de minute, asigură distrugerea sporilor.

Sporii sînt răspîndiţi în mediul extern o dată cu dejecţiile animalelor ierbivore şi ale omului, în al căror intestin trăieşte ca saprofit bacilul botulinic.

Toxinogeneza

Formele vegetative ale bacilului botulinic produc toxină la o temperatură de 22 — 37°, pe medii cu carne, ca şi pe medii vegetale, sau în conserve de fructe şi legume. Toxina posedă o putere ucigătoare enormă, fiind cea mai activă dintre toate toxinele bacteriene cunoscute. Omoară un cobai de 400 g pe cale subcutanată, în doză de 1/5 000 000 dintr-un ml. Toxina botulinică este foarte rezistentă la acţiunea agenţilor fizici şi chimici. Poate fi distrusă numai prin încălzire timp de 30 de minute la 80°. În anumite condiţii, însă, suportă chiar fierberea, mai ales dacă este amestecată cu produse alimentare care o protejează faţă de acţiunea căldurii.

Din punct de vedere antigenic, *Cl. botulinum* prezintă 5 tipuri serologice: *A*, *B*, *C*, *D*, *E*. Cele mai răspîndite în Europa sînt primele două tipuri, care joacă şi rolul principal în patogenia îmbolnăvirilor umane.

Patogenitate la om

Toate tipurile de *Cl. botulinum* dau o toxină patogenă prin ingestie. Toxinele *A* şi *B* au caracter antigenic strict specific. Serul antitoxic este valabil numai pentru toxina aparţinînd tipului care a servit la prepararea serului. Caracterele de patogenitate sînt imprimate de efectul strict toxic al infecţiei. Boala este produsă numai de ingerarea unei toxine preformate. În alimentele contaminate cu spori botulinici, în special cîrnaţi, conserve de carne, de peşte şi de legume, păstrate în condiţii de temperatură prielnică şi nesterilizate bine, sporii germinează şi elaborează toxina. Întrebuinţarea în alimentaţie a conservelor, mai ales a celor de casă, a cîrnaţilor conservaţi în grăsime fără o prealabilă sterilizare, poate produce o intoxicaţie botulinică. Toxina ingerată, absorbită la nivelul stomacului, trece în circulaţie, de unde este vehiculată către sistemul nervos.

În cîteva ore, pînă la cîteva zile de la ingerarea alimentului contaminat, apar la om următoarele simptome: greaţă, slăbiciune, dureri de cap, ameţeli, dureri abdominale, senzaţia de presiune în regiunea stomacului. De asemenea apar mai tîrziu şi tulburări nervoase, determinate de intoxicaţia următorilor nervi cranieni: facial, glosofaringian, hipoglos şi vag. Simptomele nervoase cel mai întîlnite sînt: diplopie, strabism, inegalitate pupilară, paralizie a pleoapelor, afonie, dificultate la înghițire, senzație de uscăciune în gură etc. Boala este foarte gravă și duce cele mai deseori la moarte.

Patogenitate la animale

Cele mai multe animale sînt sensibile la toxina botulinică. Se îmbolnăvesc mai ales vitele și păsările care sînt hrănite cu hrană (furaje) conservată. Experimental, iepurele, cobaiul, șoarecele, maimuța și mai ales pisica sînt sensibile la toxina botulinică. Inocularea unei culturi sau numai a filtratului de cultură produce aceleași simptome: paralizii oculare, urmate de paralizii generalizate și moarte.

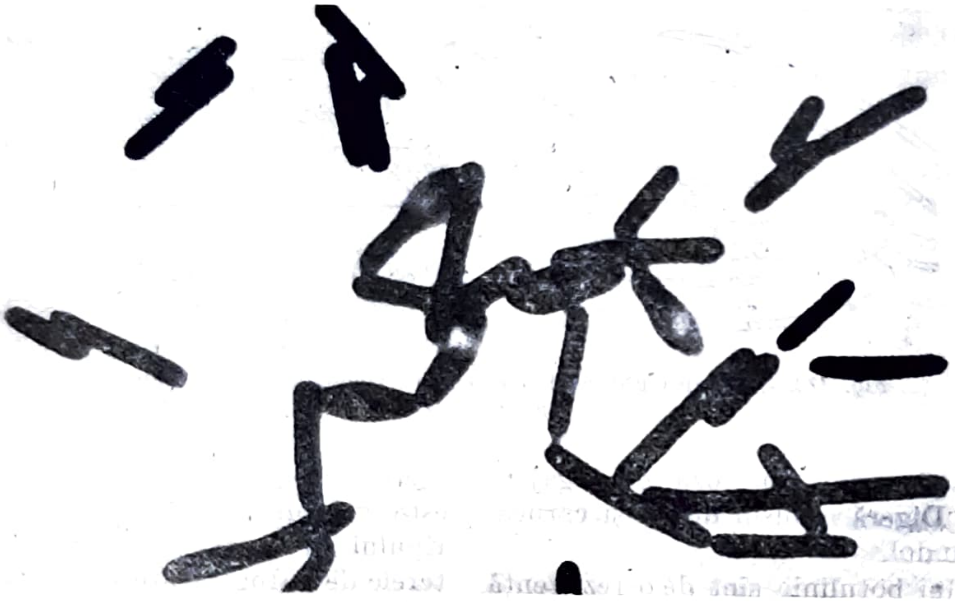


Fig. 373. — Clostridium botulinum. Frotiu din cultură. Se observă poziția centrală sau subterminală a endosporilor (colorație Gram).

Imunitate

Botulismul lasă o imunitate durabilă, în care rolul principal îl are antitoxina. Antitoxina botulinică se prepară pe cai, prin inoculare de anatoxină botulinică. Ea are acțiune neutralizantă. Tratamentul botulismului se face prin instituirea cît mai rapidă a seroterapiei. Ea se poate face cu ser monovalent specific *A* sau *B*, omolog toxinei ingerate, sau cu amestec de seruri *A* și *B* în doze masive pe cale intravenoasă, intramusculară și intrarectală, în cantitate de 300 — 600 ml.

Profilaxia

Se recomandă eliminarea conservelor care prezintă bombaj și fierberea timp de 30 de minute a conservelor de menaj înainte de consumare. Sterilitatea conservelor fabricate industrial este riguros controlată după fabricare, așa că riscurile sînt foarte mici.

Cînd apare un caz de botulism, toți cei care au consumat același aliment, chiar dacă nu prezintă simptome, trebuie să fie imunizați cu 10—20 ml ser antibotulinic.

Diagnostic de laborator

În caz de botulism, diagnosticul de laborator poate pune în evidență, fie bacilul botulinic, fie toxina sa.

Identificarea toxinei botulinice. Diagnosticul de laborator într-un caz de botulism se face, în mod obișnuit, prin identificarea toxinei botulinice. Pentru aceasta se recurge la inoculare pe animale. Alimentele suspecte, lichidul obținut prin spălături gastrice, serul sau scaunele bolnavilor, produse din conserve se suspendă în soluție clorurosodică 8,5‰, sterilă, se centrifughează sau se filtrează și se inoculează la animale. Prezența toxinei determină la șoareci paralizia membrelor posterioare, la cobai paralizia muşchilor abdominali, iar la pisică paralizia muşchilor acomodării, diaree etc. Pentru precizarea tipului de bacili care au produs intoxicaţia, tip A sau B, se fac inoculări ale produsului de cercetat în mod simultan la 6 animale de laborator, de preferinţă la şoareci. În prealabil, 2 şoareci vor primi o cantitate de ser antibotulinic A, alţi 2 ser antibotulinic B, iar ultimii 2 servesc drept martori. Dacă şoarecii imunizaţi cu ser antibotulinic A supravieţuiesc şi ceilalţi 4 şoareci mor, este dovadă că intoxicaţia a fost produsă de *Cl. botulinum* tip A. Dacă supravieţuiesc toţi şoarecii, aceasta denotă că nu este vorba de o intoxicaţie botulinică. Identificarea bacilului botulinic se poate face prin :

a) examen microscopic direct în produsul de cercetat, care pune în evidenţă bacilii sporulaţi sau spori de formă ovalară ;

b) însămînţarea produsului de cercetat, care în prealabil a fost încălzit timp de 30 de minute la 70°, în bulion glucozat anaerob, bulion V. F. şi geloză Veillon. Din colonii se pot face frotiuri şi examen proaspăt între lamă şi lamelă, pentru studiul mobilităţii.

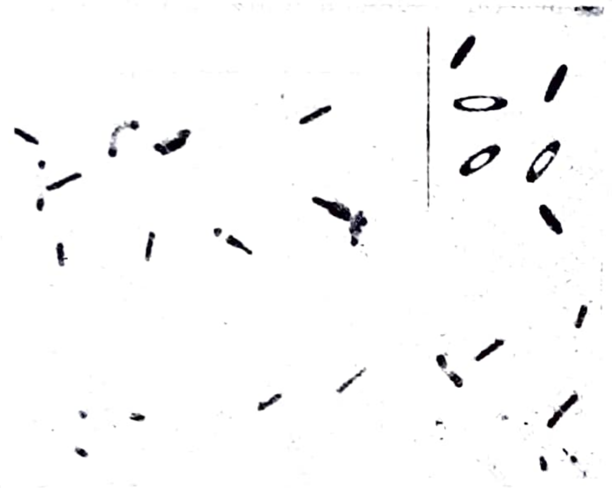


Fig. 374. — *Clostridium septicum.* Frotiu dintr-o cultură sporulată (coloraţie Gram).

DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL GANGRENEI GAZOASE

Generalităţi

Gangrena gazoasă este o infecţie gravă, provocată prin pătrunderea în ţesuturi a unei asociaţii de microbi anaerobi şi aerobi. Se caracterizează printr-un edem cu extensie rapidă, necroza ţesuturilor şi formare de gaze. Apare cel mai frecvent în urma contaminării plăgilor accidentale, uneori însă şi a plăgilor chirurgicale.

Gangrena gazoasă are aproape totdeauna o etiologie polimicrobiană. Agenţii patogeni anaerobi cel mai frecvent întîlniţi sînt : *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens*, *Cl. septicum*, *Cl. histolyticum* etc. De cele mai multe ori, la aceste specii de germeni anaerobi se adaugă specii de germeni aerobi : streptococ, stafilococ, colibacil, proteu şi piocianic, care consumă oxigenul şi creează astfel condiţii prielnice de anaerobioză. Dezvoltarea germenilor anaerobi este favorizată de existenţa plăgilor devitalizate, anfractuoase, profunde, cu resturi de corpi străini, pămînt, bucăţi de ştofă, cheaguri, fracturi, eschile osoase etc.

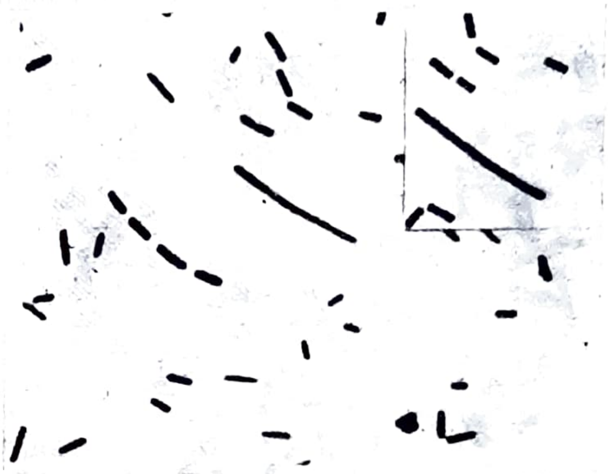


Fig. 375. — *Clostridium perfringens.* Frotiu dintr-o cultură în bulion (coloraţie Gram).

Microbii anaerobi ai gangrenei gazoase au unele caractere comune : sînt bacili sporulaţi, anaerobi, Gram-pozitiv.

Microbii gangrenei gazoase sînt la limita vieţii saprofite şi parazitare, se găsesc în stare de parazitism comensal în intestinul omului şi animalelor, de unde sînt răspîndiţi în mediul extern şi se întîlnesc sub formă de spori în aer, praf, bălegar, apă de canal etc.

Sînt microbi polimorfi, prezentînd forme mai mult sau mai puţin caracteristice pentru fiecare tip în parte : *Cl. perfringens* este un bacil scurt şi gros, capsulat și imobil, Gram-pozitiv intens; *Cl. oedematiens* este un bacil lung și gros, așezat în formă de „S“ sau „C“, Gram-pozitiv; *Cl. septicum* este un bacil subțire, drept, gram-pozitiv; *Cl. histolyticum* este un bacil scurt, Gram-pozitiv, în formă de butoiaș, prezentîndu-se totdeauna sporulat. Datorită prezenței cililor, microbii gangrenei gazoase sînt mobili, dar dotați cu mobilitate redusă, în afară de *Cl. perfringens*, care este imobil. Nu sînt capsulați, cu excepția *Cl. perfringens*, care este capsulat.

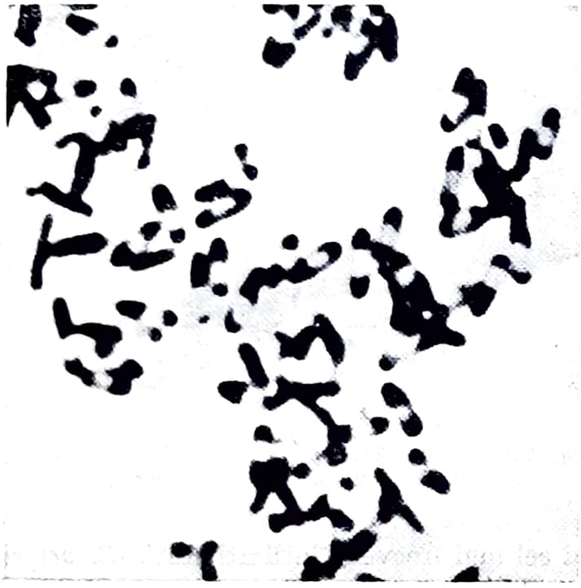


Fig. 376. — Frotiu dintr-o cultură de *Cl. histolyticum* (colorație Gram). Se vede imaginea centrală necolorată a sporului care depășește diametrul celulei bacteriene și conferă aspectul tipic de butoiaș. Preparat original (× 1 000).

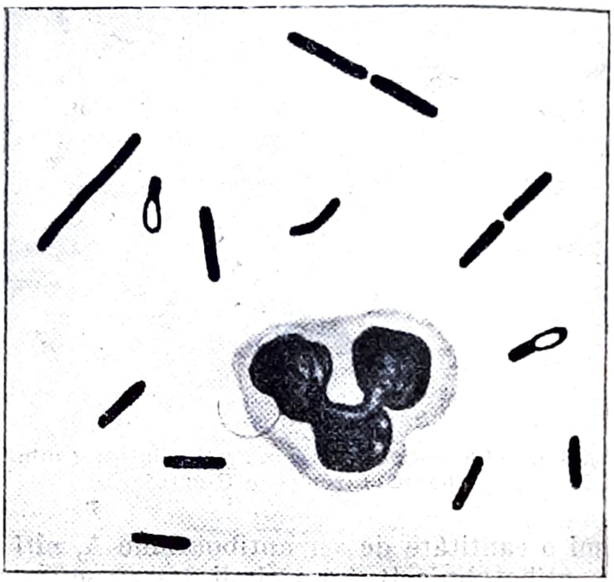


Fig. 377. — *Clostridium oedematiens.* Frotiu din serozitatea unei leziuni experimentale la cobai (colorație Gram).

În bulion V. F. cu ou (digestie peptică de carne de vițel, ficat de vițel și stomac de porc; pH = 7,8; cu fragmente de albuș de ou coagulat), în anaerobioză, germenii gangrenei gazoase se dezvoltă tulburînd uniform mediul, cu producere de gaz, cu excepția *Cl. histolyticum*, care nu produce gaz. În geloză semisolidă (0,5%) în tuburi Weinberg, *Cl. perfringens* dă colonii lenticulare mici (tulpină imobilă); ceilalți microbi, care sînt tulpini mobile, dau colonii difuze cu centrul opac.

Strict anaerobi, se dezvoltă la o temperatură de 33—37° și la un pH = 7,6—8. Fermentează o serie de zaharuri, însă fermentarea nefiind constantă, nu constituie un criteriu de diferențiere. Mediul Kondratieva, compus din lapte pulbere, peptonă, ClNa, glucoză, sulfat de sodiu și clorură ferică ne ajută la diferențierea *Cl. perfringens* care înnegrește acest mediu, spre deosebire de ceilalți 3, care nu-l înnegresc, reduc roșul neutru, turnesolul și albastrul de metilen.

Comportarea bacililor gangrenei gazoase față de lapte, serul coagulat, gelatină, precum și producerea de indol și hidrogen sulfurat constituie caractere diferențiale pe care le prezentăm în tabelul 134.

Prin sporii lor, bacilii gangrenei gazoase prezintă o rezistență destul de crescută față de agenții fizici și chimici.

Bacilii gangrenei gazoase elaborează, în culturi pe bulion V.F. sau bulion Pope, cu digestie pancreatică de carne, o toxină puternică. Toxinele gangrenoase conțin mai mulți factori de patogenitate, grație cărora invadează organismul infectat:

a) *hialuronidaza* acționează prin hidroliza acidului hialuronic, a cimentului intercelular, prin a cărui distrugere țesuturile devin mai permeabile la răspîndirea microbilor;

TABELUL 134

Caracterele biochimice şi de patogenitate prin care se deosebesc microbii gangrenei gazoase

	Cl. perfringens	*Cl. oedematiens*	*Cl. septicum*	*Cl. histolyticum*
Lichefierea gelatinei	+	−	+	+
Lapte	Coagulează şi produce cheag alveolar	Coagulează	Coagulează	Coagulează şi digeră
Digestia serului coagulat	−	−	−	+
Producerea de H_2S	+	±	±	±
Indologeneză	+	−	−	−
Mediul Kondratieva	Înnegreşte	−	−	−
Patogenitate la cobai, inoculat intramuscular	Flegmon gazos	Edem albicios gelatinos	Edem seros roşiatic	Histoliza ţesuturilor de la derm pînă la os. Amputaţie spontană

b) *lecitinaza* distruge membrana elementelor celulare din ţesuturi şi le face accesibile la acţiunea celorlalte enzime;

c) *coagulaza* fragmentează fibrele de colagen şi, prin distrugerea ţesutului conjunctiv, ajunge la distrugerea muşchiului. Toxinele gangrenoase sînt titrate prin injectare pe cale intravenoasă la şoarece, determinîndu-se D.L.M. Ele pot fi transformate în anatoxină prin formolare şi incubare la 37°. Toxina *Cl. perfringens* poate fi titrată şi *in vitro* cu emulsie de lecitovitelin.

Patogenitatea la om

Patogenitatea bacililor gangrenei gazoase este dominată de caracterul toxemic al infecţiei. Microbii pătrunşi în plagă invadează masa musculară şi dau edem cu bule de gaz, cheaguri brune, miros putrid, ţesuturile devin purpurice, se sfacelează şi iau aspect de putriditate cadaverică.

Simptomele gangrenei gazoase sînt: dureri locale violente, edem crepitant gazos, anxietate, cianoză, febră, intoxicaţie generală. În cazurile netratate mortalitatea este de 100%.

Importanţa cea mai mare în patogenia gangrenei gazoase o are *Cl. perfringens*, care este găsit constant în asociaţia microbiană ce determină această infecţie.

Gangrena gazoasă apare de cele mai multe ori în urma unei plăgi, murdărite cu pămînt şi netratate adecvat. Uneori infecţia gangrenoasă poate apărea şi în urma injecţiilor intramusculare cu substanţe medicamentoase: clorură de calciu, ulei camforat, adrenalină etc. Acestea se datoresc introducerii sporilor o dată cu medicamentul nesteril sau nesterilizării instrumentelor utilizate.

În afară de gangrena gazoasă a plăgilor, microbii gangrenei gazoase mai produc la om flegmonul gazos, septicemia puerperală, apendicita gangrenoasă, gangrena pulmonară, stomatita ulceroasă, gangrena pulpară.

Patogenitatea la animale

În condiţii naturale provoacă la ovine şi bovine îmbolnăviri diverse: dizenterie, toxemie, enterită toxică.

Experimental, şoarecele, cobaiul şi iepurele sînt sensibili la gangrena gazoasă. Prin inocularea bacteriilor sau toxinelor intramuscular, la cobai, se obţin leziuni caracteristice pentru fiecare. Inocularea intravenoasă la iepure sau şoarece provoacă moartea în scurt timp. Inocularea intradermică provoacă dermonecroză.

Imunitatea

Gangrena gazoasă nu dă imunitate la om. Se poate conferi animalelor o imunitate antitoxică, prin inocularea de anatoxină gangrenoasă. Seroprofilaxia şi seroterapia se fac la om cu ajutorul serului antigangrenos polivalent.

TABELUL 135

Principalele caractere morfobiologice ale bacteriilor anaerobe telurice (adaptat după Mackie și McCartney, 1956)

Specia	Morfologia în cultură	Mobilitate	Gram	Colonii pe geloză-sînge Zeissler	Culturi în bulion-ficat	Medii cu lapte	Lichefierea serului coagulat	Fermentarea carbohidraților					Putere patogenă experimentală la cobai și șoarece
								Glucoză	Lactoză	Sucroză	Maltoză	Salicină	
Clostridium perfringens	Bacili mari, drepți, groși Sporii absenți	−	+	Mari, neregulate cu margini rotunde, hemolitice	Produce gaz, fără digestie	Coagulează cu cheag alveolar	−	+	+	+	+	±	Flegmon gazos la cobai. Omoară șoarecele prin toxină
Clostridium septicum	Bacili mari cu spor central	+	+	Transparente, neregulate, obișnuit hemolitice	Produce gaz fără digestie	Coagulează lent	−	+	+	−	+	+	Omoară cobaiul și șoarecele Edem seros la cobai
Clostridium oedematiens	Bacili mari pleomorfi cu spor central sau subterminal	+	+	Transparente, plate, confluente, hemolitice	Produce gaz fără digestie	Coagulează inconstant și lent	−	+	−	−	+	−	Edem gelatinos la cobai. Omoară șoarecele
Clostridium tetani	Bacili subțiri cu spor terminal	+	+	Transparente, cu prelungiri și franjuri hemolitice	Gaze fetide, ușoară digestie	Nu modifică	−	−	−	−	−	−	Omoară cobaiul și șoarecele prin toxină Tetanos experimental
Clostridium tetanomorphum	Bacili subțiri cu spor terminal	+	+	Mici, neregulate, transparente	Gaze fără miros, fără digestie	Nu modifică	−	+	−	−	+	−	Nepatogen pentru om și animale
Clostridium fallax	Bacili mari, groși Sporii absenți sau rari	+	+	Mari, opace, neregulate	Gaz, fără digestie	Coagulează lent	−	+	+	+	+	+	Omoară șoarecele la izolare
Clostridium sporogenes	Bacili subțiri cu spor central sau subterminal	+	+	Cap de meduză, hemolitice	Gaze fetide, digestie	Coagulează și digeră	+	+	−	−	+	±	Patogen numai în asociație
Clostridium hystolilicum	Bacili scurți cu spor central sau subterminal Forme „în butoiaș"	+	+	Mici, transparente, neregulate, hemolitice	Gaze fetide, digestie	Coagulează și digeră	+	±	−	−	±	−	Omoară cobaiul și șoarecele prin histoliză și amputație spontană

Serul antigangrenos polivalent este un amestec de seruri specifice recoltate de la caii hiperimunizați monovalent cu toxina principalilor germeni gangrenoși: *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens*, *Cl. septicum* și *Cl. histolyticum*. Se întrebuințează în profilaxia și terapia toxiinfecției gangrenoase, precum și în tratamentul unor afecțiuni în care se constată prezența microbilor gangrenoși: melena nou-născuților, colita ulceroasă, însoțită de fenomene generale, febra tifoidă complicată de perforații, apendicitele hipertoxice sau gangrenoase, peritonitele circumscrise sau difuze, angina Ludwig, anginele ulceronecrotice primitive sau postscarlatinoase, difteriile maligne, însoțite de fetiditate faringiană și orală, cînd se asociază cu antitoxina difterică, gangrena pulmonară, gangrena penisului, noma.

Administrarea serului se poate face:

1. *În scop preventiv:* se aplică în cursul primelor ore de la rănire, în toate cazurile grave, care prezintă zdrobiri mari de țesuturi, corpi străini, fracturi deschise, plăgi murdărite cu pămînt sau dejecții:

a) *doza:* 20—40 ml ser antigangrenos polivalent;

b) *calea de administrare:* intramusculară.

2. *În scop terapeutic:* în cazurile de gangrenă gazoasă, cît mai precoce. Seroterapia va fi completată obligatoriu cu tratamentul cu antibiotice, tratament chirurgical și simptomatic:

a) *doza:* 100—200 ml ser antigangrenos polivalent;

b) *calea de administrare:* intramuscular, dacă fenomenele locale (tumefacție, infiltrație gazoasă, edem, simptome limitate) sînt incipiente; intravenos, cînd semnele locale sînt mai întinse și însoțite de stare toxică;

c) *durata tratamentului:* dozele recomandate se repetă 2—3 zile. Durata tratamentului seroterapic nu va depăși 4 zile.

Diagnosticul de laborator

Studiul bacteriologic al unui caz de gangrenă gazoasă este de lungă durată și complicat.

Prelevarea materialului patologic. Se recoltează serozitate de la suprafața plăgilor sau din profunzime sau sînge, care se însămînțează (2—3 ml) în geloză semisolidă, în tuburi lungi și înguste de 25—30 cm.

Examenul produsului recoltat din plagă se face prin:

a) Preparat proaspăt pentru studiul mobilității. Frotiul colorat Gram arată bacili Gram-pozitiv sporulați și lipsa reacției fagocitare. În cazul asociației cu microbi aerobi, reacție fagocitară intensă.

b) Însămînțarea și izolarea bacteriilor anaerobe. Se însămînțează produsul patologic într-un mediu lichid anaerob. După cîteva zile, se inactivează cultura la 80°, timp de o jumătate de oră, pentru distrugerea formelor vegetative, apoi se procedează la izolarea coloniilor pe geloză semisolidă în tuburi Weinberg. Identificarea coloniilor izolate se face prin: frotiu, cercetarea caracterelor de cultură, biochimice și inocularea la animale sensibile.

Produsul patologic (serozitatea din plagă) poate fi inoculat intramuscular la cobai, fie ca atare, fie de preferat, după ce s-au obținut colonii izolate. Cobaiul moare în cîteva ore, cu leziuni caracteristice; cînd bănuim prezența unei gangrene gazoase, se încearcă proba neutralizării, inoculînd la un animal serozitate, iar la alt animal amestec de serozitate și ser polivalent antigangrenos. În cazul cînd este prezentă asociația microbiană a gangrenei gazoase, cobaiul inoculat cu amestec supraviețuiește.

c) Pentru un diagnostic rapid se poate face și reacția de aglutinare pe lamă cu seruri aglutinante monovalente, care poate fi citită cu ochiul liber sau la microscop.

Din toxinele obținute prin cultură se poate face proba neutralizării cu serurile specifice monovalente și prin aceasta, se poate pune diagnosticul de tip. Un volum de 0,3 ml din supernatantul culturii centrifugate a bacilului de identificat este adăugat la cîte un volum de 0,2 ml de ser specific anti-*perfringens*, *oedematiens*, *septicum* și *histolyticum*. După o incubare de 30 de minute la termostat, amestecurile sînt inoculate intravenos la șoareci albi de 18—20 g. Serul care protejează șoarecii timp de 3 zile stabilește identitatea toxinei.

BACTERIILE ANAEROBE NETELURICE CARE PREZINTĂ IMPORTANȚĂ PENTRU PATOLOGIA INFECȚIOASĂ UMANĂ

SPHEROPHORUS (BACILLUS) FUNDULIFORMIS

Microb care se întîlnește sub formă de parazit comensal în cavitățile naturale ale omului și animalelor, în special frecvent pe mucoasele căilor genitale la femeie. Rolul său patogen se manifestă în special la organismele debilitate cu reactivitate scăzută a țesuturilor. În aceste condiții poate provoca septicemii de origine faringiană, intestinală, uterină sau urinară sau supurații necrotice cu localizări variate. Mai frecvent întîlnite sînt otitele, mastoiditele, pleureziile, abcesele pulmonare și hepatice cu *B. funduliformis*.

Diagnosticul de laborator

Produsul patologic poate fi sînge, în cazurile septicemice sau puroi. În frotiul direct din puroi, colorat cu Gram, apare ca un bastonaș fin, de 2—3 μ lungime, nesporulat, necapsulat, Gram-negativ, uneori mai intens colorat la extremități.

Sîngele se recoltează după tehnica de recoltare pentru hemocultură și se însămînțează fie în bulion glucozat anaerob, fie în geloză Veillon.

B. funduliformis izolat prin hemocultură prezintă un polimorfism accentuat; în aceeași colonie putem găsi 3 forme diferite: elemente bacilare tipice de 2—3 μ, elemente bacilare filamentoase, flexuoase, cu extremitățile adeseori umflate, și elemente sferice, voluminoase, libere sau în grămezi, cu diametrul de 3—12 μ, care se colorează neuniform, granular, în roșu, cu colorația Gram.

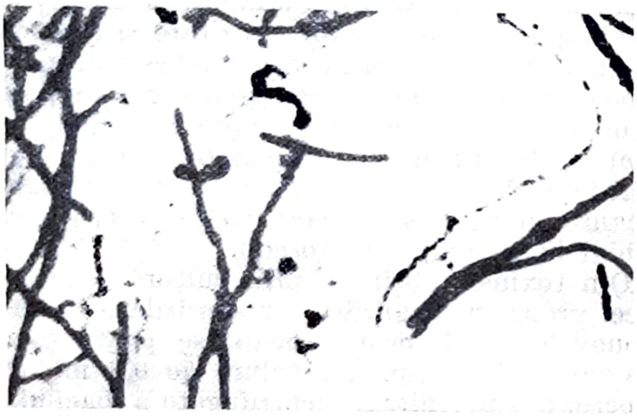


Fig. 378. — Spherophorus (Bacillus) funduliformis. Frotiu din cultură în geloza Veillon.

Microbul este anaerob strict, cu dezvoltare la temperatura optimă de 33—35°. Culturile sînt producătoare de gaz cu miros fetid. În geloza Veillon apar în 2—3 zile colonii lenticulare, de 2 mm diametru, însoțite de ruperea coloanei de geloză, datorită producerii de gaz.

În geloza Veillon-sînge produce hemoliză. În bulion-ficat, se dezvoltă abundent, cu producere de gaze fetide și depozit floconos. Nu lichefiază gelatina, lizează hematiile umane și fermentează aproape toate zaharurile. Puterea patogenă experimentală poate fi pusă în evidență prin inoculare la cobai sau, de preferință, la iepure. Pe cale subcutanată, cultura produce abcese locale fetide, urmate de moartea animalului. Pe cale intravenoasă, cînd tulpina izolată este foarte virulentă, determină o septicopioemie mortală, cu abcese necrotice în ficat și plămîn. Cînd tulpina este puțin virulentă, se obțin infecții localizate sub forma de artrite supurate, după un interval de 3—4 săptămîni.

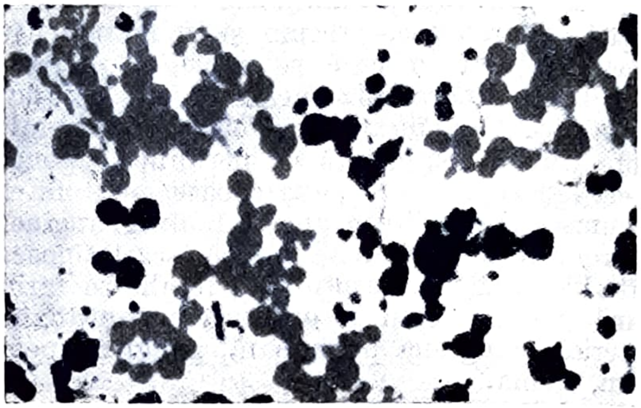


Fig. 379. — Spherophorus (Bacillus) funduliformis. Colonii în geloză Veillon.

RISTELLA FRAGILIS

Parazit comensal în cavitățile naturale, gură, faringe, intestin, căile genitale la femeie. Este capabil să determine, singur sau în asociație, apendicite gangrenoase, gangrene pulmonare, supurații periuretrale.

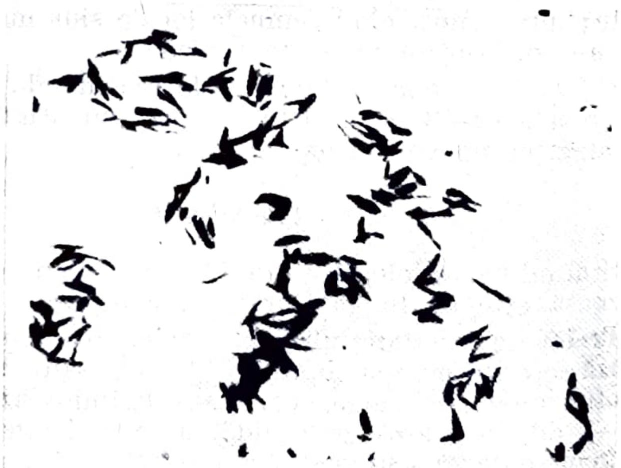


Fig. 380. — Ristella fragilis. Frotiu din cultură în geloză Veillon.

TABELUL 136

Principalele caractere morfobiologice ale bacteriilor anaerobe netelurice importante pentru patologia umană

Specia	Morfologie	Mobilitate	Gram	Colonii în geloză Veillon	Culturi în bulion-ficat	Indol	Lapte	Fermentarea glucidelor	Hemoliză	Putere patogenă experimentală
Sph. funduliformis	a) bacil fin 2—3μ b) elem. filament c) elem. sferic, 4-12 μ	—	—	Colonii lenticulare + gaz	Floconoasă gaze fetide +	—	Creşte lent	+	+	Cale i.v. = septicopiemie şi artrită supurată
R. fragilis	Bacili scurţi, 1—2μ	—	—	Colonii punctiforme	Cultură bogată, necesită ser	—	Lent	+	—	Cale subcutanată, flegmon gazos
Z. serpens	Bacili scurţi, 1—2μ	+	—	Colonii fine abia vizibile	Tulbură uniform, gaze fetide	—	Lent	+	—	Cale subcutanată, abcese
F. fusiformis	În fus + polimorfism	—	—	Colonii lenticulare + gaz	Cultură bogată, necesită ser gaze fetide +	urme	Lent	+	—	Numai în asociaţie
R. ramosum	Bacili de 3 μ, aşezaţi în *V*, *L*, Y	—	+	Colonii lenticulare	Tulbură uniform, gaze cu miros acru	—	Creşte rapid	+	—	Slabă

Examenul direct al frotiului din produsul patologic colorat cu Gram scoate în evidenţă prezenţa unui bacil scurt, cu capetele rotunjite, de 1—2 μ lungime, nesporulat, necapsulat şi imobil.

Se colorează destul de greu, colorarea cu fucsina diluată trebuind prelungită pînă la 1—2 minute. Adeseori apare colorat bipolar. Nu apar niciodată forme globuloase, ca la *B. funduliformis*.

Anaerob strict, necesită, pentru dezvoltare, prezenţa serului sanguin. Creşterea în cultură se face lent şi cu degajare minimă de gaze. În geloza Veillon-ser se dezvoltă lent în 3—4 zile, sub forma de colonii mici punctiforme, apoi ovalare, cu degajare minimă de gaze.

În bulion-ficat plus ser sau ascită creşte lent, tulburînd mediul. Fermentează glucoza şi zaharoza, cu producere uşoară de gaz şi miros fetid.

Ristella fragilis are o putere patogenă redusă pentru animalele de laborator. Inocularea unei culturi pe cale subcutanată la cobai provoacă un flegmon gangrenos, care se poate vindeca, sau duce la moartea animalului prin caşexie după 10—20 de zile.

ZUBERELLA SERPENS

Parazit comensal în flora intestinală umană, se întîlneşte mai frecvent în apendice. Mai poate fi întîlnit şi pe mucoasa căilor respiratorii.

Puterea patogenă proprie este foarte slabă, aşa că îl întîlnim exclusiv ca microb de asociaţie în otomastoidite supurate, în gangrene pulmonare, în pleureziile putride şi apendicitele gangrenoase. La examenul direct al frotiului apare ca bacil scurt, drept, de 1,2—2 μ lungime, asporulat, cu mobilitate redusă, Gram-negativ, uneori colorat bipolar.

Anaerob strict, creşte în geloza Veillon sub forma de colonii mici, fine, de culoare cenuşie, care după cîteva zile se înconjură cu numeroase formaţiuni filamentoase. În bulion-ficat tulbură intens mediul şi produce un depozit albicios, cu degajare de miros fetid. Fermentează glucoza, lactoza, levuloza, maltoza, cu degajare de gaze. Infecţia experimentală se realizează la iepure, cobai sau şoarece, la care inocularea culturii pe cale subcutanată produce abcese localizate, ducînd la moartea animalului prin caşexie.

RAMIBACTERIUM RAMOSUM

Parazit comensal în cavitățile naturale ale omului, mai ales pe mucoasa rinofaringelui, intestinului și căilor urinare. Este patogen pentru om numai în asociație cu floră anaerobă și se întîlnește în gangrena pulmonară, abcesele pulmonare, otite și mastoidite, pleurezii purulente sau putride, cistite, colecistite, apendicite și infecții dentare. A putut fi izolat, prin hemocultură, din septicemii și septicopiemii.

La examenul direct al produsului patologic se observă un bacil drept, sinuos, de 2—3 μ lungime, uneori filamentos, așezat caracteristic în *V*, *L* și Y, asemănător bacilului difteric. Este imobil, nesporulat, lipsit de capsulă și Gram-pozitiv.

Strict anaerob, în culturi își însoțește creșterea de producere de gaze lipsite de miros fetid. În geloza Veillon crește sub formă de colonii lenticulare, în bulion-ficat tulbură omogen și produce mult gaz cu miros acru. Fermentează toate glucidele folosite curent în bacteriologie.

Puterea patogenă experimentală este foarte slabă. Unele tulpini foarte virulente sînt capabile să producă abcese locale la animalele de laborator. În asociație cu flora anaerobă sau aerobă poate produce, la cobai, gangrene viscerale și supurații gangrenoase.

FUSIFORMIS FUSIFORMIS

Parazit comensal al mucoaselor cavității bucale și vaginale la om, specia *F. fusiformis* se caracterizează printr-un polimorfism accentuat. Dintre bacilii fuziformi care sînt foarte numeroși, este singura specie care interesează, într-o anumită măsură, patologia umană.

Rolul patogen al acestei specii, rareori singură în leziuni și de obicei asociată cu spirochetele, este destul de important, determinînd în organismul uman următoarele localizări patologice: angina Vincent, adenita cervicală, stomatita ulceroasă, pioree alveolară, balanită gangrenoasă, pleurezii putride, piemii, septicemii, abcese hepatice, meningite și peritonite purulente.

La examenul direct al produsului patologic, majoritatea bacililor au aspectul tipic de bastonaș cu vîrfurile ascuțite, formă de fus cu protoplasma granuloasă și vacuolară și prezență de granulații metacromatice. Microbul ete imobil, nesporulat, necapsulat, și Gram-negativ. În frotiul din produsul patologic există adesea, alături de formele fuziforme tipice și elemente sinuoase și forme sferoidale, de 1,5—3μ diametru.

În culturi se comportă ca anaerob strict, iar pentru izolare inițială din produsul patologic este necesară prezența serului, ascitei sau sîngelui defibrinat. În geloza Veillon-ser crește sub formă de colonii lenticulare, iar coloana de agar se rupe, datorită degajării masive de gaz. În bulionul glucozat cu ser sau ascită crește, tulburînd uniform mediul, și formează un bogat depozit floconos. Mediul supernatant se limpezește prin depunerea depozitului și de gaze cu miros fetid. Fermentează toate glucidele și coagulează lent laptele.

Puterea patogenă experimentală este nulă în cultură pură; ea poate apărea doar în urma asocierii cu spirochetele saprofite sau bacterii saprofite diverse.

STREPTOCOCII ANAEROBI

Se întîlnesc în cavitățile naturale ale omului și animalelor, în special în vagin. Rolul lor patogen este important, în special în septicemiile consecutive unei infecții uterine. Îi întîlnim adeseori în otite, mastoidite, apendicite supurate, abcese pulmonare, pleurale și genito-urinare.

Există specii de streptococi anaerobi care produc gaze și miros fetid, ca de pildă *Streptococcus anaerobius*, *Streptococcus putridus*, *Streptococcus fetidus*. Alte specii, ca *Streptococcus intermedius*, nu degajează nici gaze, nici miros fetid. Există, de asemenea, unele specii care, după o fază de dezvoltare în strictă anaerobioză, trec prin faza de microaerofilie și tind să devină aerobi, ca de pildă *Streptococcus evolutus*. În produsele patologice apar sub formă de elemente cocale fine, Gram-pozitive, așezate în lanțuri scurte, adeseori duble sau în zig-zag.

În mediile de cultură lichide se dezvoltă prin formare de depozit floconos, degajare de gaze cu miros fetid, cu excepția *Str. fetidus*, care tulbură uniform bulionul. În geloza Veillon se dezvoltă sub formă de colonii lenticulare. Fermentează glucoza și levuloza. Streptococii care nu degajează gaze cu miros fetid se aseamănă cu ceilalți streptococi anaerobi descriși.

Puterea patogenă experimentală este foarte slabă în general; singur *Str. fetidus* poate determina abcese subcutanate și gangrene cu tendința la extensie, care duc la moartea animalului de experiență.

TABELUL 137

Caracterele diferențiale ale streptococilor anaerobi

Specia și morfologie		Cultura în bulion-ficat	Coagularea laptelui	Tip de colonie în geloza Veillon	Lichefierea gelatinei	Acetil-metil-carbinol în bulion-ficat glucozat 1%	Glucide		Termorezistența la 80°, timp de 2 minute	
							Maltoză	Lactoză		
Specii care degajă gaze cu miros fetid	*Streptococcus anaerobius*, coc de 0,8μ, lanțuri scurte sau lungi Gram-pozitive	**Creștere grunjoasă, ușor fetidă, producere de SH₂**	—	Lenticulare și gaz	—	+	+	—	+	
	Streptococcus putridus, coc de 0,8μ, în lanțuri scurte, Gram-negativ	Tulbură omogen	—	Lenticulare și gaz fetid pe geloză-sînge, halou negru în jurul coloniei	—	+	+	—	—	
	Streptococcus foetidus, coc de 1 μ, în lanțuri, Gram-pozitiv	Creștere grunjoasă		Lenticulare și gaz abundent	—		—	—	—	
Specii care nu degajă gaz, nici miros fetid	*Streptococcus intermedius*, coc de 0,6μ, lanțuri scurte, Gram-pozitiv	Tulbură omogen, microb serofil	+ după 24 de ore	Lenticulare pe geloză-sînge, hemoliză α	—	+	+	+	—	**Apropiat de streptococii lactici**
	Streptococcus evolutus, coc de 0,7μ, în lanțuri scurte, Gram-pozitiv	Creștere grunjoasă	+ după 30 de ore cu retracția cheagului	Lenticulare pe geloză-sînge, hemoliză α	+ după 2 – 8 zile	±	+	+	—	**Forme de trecere spre enterococ și streptococ piogen**

TABELUL 138

Caracterele diferențiale ale stafilococilor anaerobi

Specia și morfologie	Cultura în bulion-ficat	Indol	Coagularea laptelui	Tip de colonie în geloza Veillon	Lichefierea gelatinei	Acțiune asupra glucidelor	Formare de acetil-metil-carbinol în bulion-ficat glucozat 1%
Staph. anaerobius, coc de 0,5 μ, Gram-pozitiv	Tulbură abundent, cu depozit grunjos	—	—	Colonii lenticulare	—	±	+
Staph. aerogenes, coc de 0,7 μ, în grămezi și lanțuri scurte, Gram-pozitiv	Serofil, tulbură abundent pe bulion-sînge, hemoliză	În apă peptonată cu ser +	—	Lenticulare, de culoare albă-gălbuie, însoțite de gaz	—	+ Și gaz	+
Staph. activus, coc de 1 μ, Gram-pozitiv	Tulbură abundent, cu gaz și miros fetid	+	+ după 48 de ore	Lenticulare și gaz	+ după 48 de ore	+	+

STAFILOCOCII ANAEROBI

Se întîlnesc în cavitățile naturale la om, mai ales în rinofaringe și căile genitale. Rolul lor patogen se limitează la provocarea unor infecții bucofaringiene și genitale.

Grupul stafilococilor patogeni anaerobi cuprinde 3 specii: *Staph. anaerobius*, *Staph. aerogenes* și *Staph. activus*. Caracterele lor diferențiale le redăm în tabelul 138.

DETERMINAREA SPECTRULUI DE SENSIBILITATE LA ANTIBIOTICE A BACTERIILOR ANAEROBE

Metodele de testare a sensibilității *in vitro* la antibiotice a bacteriilor anaerobe sînt încă puțin folosite în practica diagnosticului de laborator, deși necesitatea și utilitatea acestei determinări este unanim acceptată.

Această situație se datorește, pe de o parte, necunoașterii acestor metode, iar pe de altă parte dificultății tehnice de realizare a unor metode complicate descrise în literatură.

Datorită faptului că un colectiv de specialiști din Institutul „Dr. I. Cantacuzino" a reușit, în ultimii ani, printr-o muncă susținută, să realizeze o metodă simplificată și eficace de testare, socotim util să redăm mai jos în întregime această metodă, așa cum a fost concepută de J. Bittner, Viorica Voinescu și S. Antohi.

Autorii preconizează folosirea metodei difuzimetrice calitative în agar, fie cu tehnica rondelelor dinainte impregnate, fie utilizînd soluții de antibiotice preparate extemporaneu cu care se umectează rondelele sterile cu diametrul de 5 mm.

Diluțiile de antibiotice. Se prepară soluții de antibiotice în apă distilată sterilă în următoarele concentrații:

- penicilină 1 μ/ml
- streptomicină 5 γ/ml
- cloramfenicol 5 γ/ml
- aureomicină 5 γ/ml
- tetraciclină 5 γ/ml
- erytromicină 5 γ/ml
- tyrocidină 5 γ/ml
- tyrotricină 5 γ/ml
- bacitracină 2 u./ml
- nitrofuran 5 γ/ml
- polimixină B 5 γ/ml
- magnamicină 5 γ/ml

Folosirea rondelelor impregnate cu antibiotice preparate la Institutul „Human" din Budapesta a dat rezultate identice cu rondelele umede și ele pot fi folosite în aceleași condițiuni.

Mediul de cultură. Mediul de bază folosit pentru testare este bulion-ficat și carne cu adaos de geloză 2% și acid tioglicolic în proporție de 0,6‰. Adaosul de acid tioglicolic are drept scop scăderea rH-ului (potențialul de oxidoreducție) din mediul de cultură la valori de rH=6—7, deci aproape de limitele inferioare ale valorilor minime de creștere, necesare bacteriilor strict anaerobe. Autorii recomandă testarea, în prealabil, a mediul preparat pentru prezența creșterii, tocmai pentru a verifica dacă adaosul de acid tioglicolic nu a determinat o scădere prea marcată a rH care ar produce o inhibiție a creșterii.

Tulpina de cercetat. Tulpina de testat, izolată în cultură pură, este cultivată într-un mediu lichid anaerob, de preferință bulion V. F. Pentru însămînțare se folosește o cantitate de 0,5—1 ml din cultura de 18 ore în bulion V. F.

Tehnica de lucru. Pe suprafața interioară a capacului (jumătatea cu diametrul mare) unei cutii Petri sterile cu diametrul de 15 cm, se așază cu o pensă sterilă 4—6 rondele sterile din hîrtie de filtru cu diametrul de 5 mm. Rondelele sînt numerotate, înainte de sterilizare, cu cifre arabe 1, 2, 3 etc. și corespund fiecare unei diluții de antibiotic. Cu ajutorul unei anse bacteriologice cu diametrul buclei de 2 mm se încarcă o picătură din prima diluție de antibiotic și se depune pe rondela corespunzătoare. Se flambează ansa și se depune o picătură pe rondela următoare și așa mai departe. După terminarea operației de umectare cu diluții de antibiotic a rondelelor se trece la fixarea lor de capacul cutiei Petri prin depunerea cu ajutorul unei pipete Pasteur a 3 picături din mediul gelozat topit și răcit la 45°. După răcirea și solidificarea picăturilor de geloză și fixarea rondelelor se toarnă în capacul cutiei Petri 50 de ml din mediul gelozat inoculat în prealabil cu 0,5—1 ml din cultura tulpinei de testat. Se aplică apoi deasupra cealaltă jumătate a cutiei Petri (cea cu diametrul mic) care pătrunzînd în stratul de geloză asigură închiderea etanșă a conținutului. Datorită conținutului în acid tioglicolic care asigură menținerea unui rH scăzut și închiderii etanșe a culturii, incubarea se efectuează la termostatul de 37°, fără a mai fi necesar un aparat pentru realizarea și menținerea anaerobiozei.

Citirea rezultatelor se face după 18—36 de ore prin măsurarea diametrului zonei de inhibiție cu ajutorul unui dublu decimetru. Schema de citire și interpretare a rezultatelor propusă de autorii sus-citați este următoarea:

— zona de inhibiție cu Ø sub 15 mm = rezistența;
— „ „ „ între 15 și 20 mm = sensibilitate moderată;
— „ „ „ între 20 și 30 mm = sensibilitate;
— „ „ „ între 30 și 40 mm = sensibilitate accentuată;
— „ „ „ peste 40 mm = sensibilitate foarte accentuată.

Din cercetările efectuate cu 62 de tulpini de clostridii variate rezultă că sensibilitatea proporțională la antibiotice este următoarea:

— penicilină, aureomicina, cloramfenicol, teramicină, tetraciclină, eritromicină și magnamicină. Tulpinile studiate au fost insensibile la nitrofuran, neomicină, streptomicină, polimixină, gramicidină, tirotricină și tyrocidină. Dintre toate antibioticele penicilina s-a impus ca antibiotic de elecție prin marea sensibilitate arătată de majoritatea tulpinilor de bacterii anaerobe.

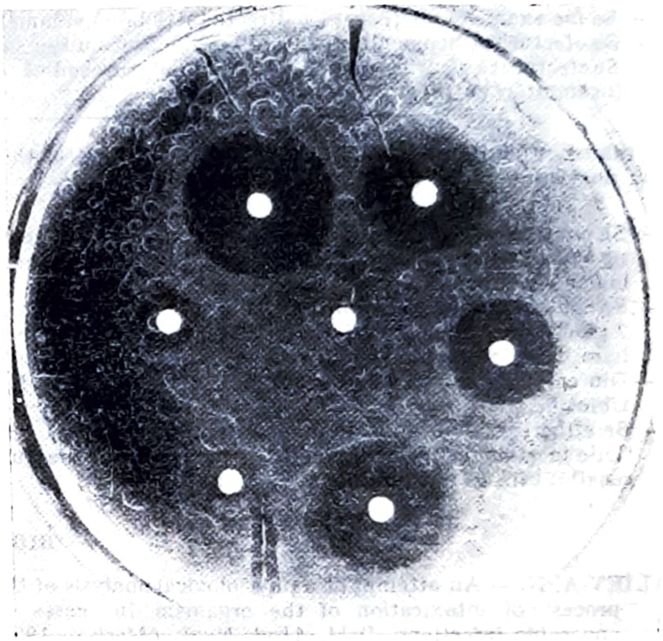


Fig. 381. — Metoda testării sensibilității la antibiotice a microbilor anaerobi.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU MICROBI ANAEROBI SPORULAȚI

Schema de diagnostic A

***Produse patologice*:** serozitate din plagă, fragmente de țesuturi necrozate, sol contaminat, fragmente de cordon ombilical, catgut, soluții medicamentoase

— Se efectuează frotiuri cu ansa din serozitatea plăgii suspecte și prin amprentă din fragmentele de țesuturi necrozate, frotiurile se colorează Gram și albastru de metilen. Se urmărește prezența bacililor Gram-pozitivi sporulați, *Cl. histolyticum* se recunoaște ușor după forma caracteristică de butoiaș și eventual flora de asociație aerobă gram-pozitivă și negativă. În unele situații, cum este, de pildă, cazul unei plăgi suspecte de infecție gangrenoasă este necesar să eliberăm un buletin de analiză cu rezultatele examenului direct al produsului.

— Din produsul patologic de cercetat se efectuează o suspensie simplă în 5—10 ml de soluție clorurosodică 8,5‰ sterilă, sau prin triturare într-un mojar steril în cazul fragmentelor de țesuturi necrozate.
Suspensia se încălzește timp de 30 de minute la 70°, apoi se efectuează însămînțarea a 3—5 ml din suspensie într-un balonaș cu 100 ml bulion glucozat anaerob și se incubează la 37°. După 3—5 zile se aspiră cu o pipetă sterilă 8—10 ml din bulionul însămînțat, se încălzește timp de 30 de minute la 70°, pentru a distruge toate formele vegetative, și se fac însămînțări în vederea obținerii coloniilor izolate prin tehnica diluțiilor în 6 tuburi Weinberg cu geloză moale 0,5 %. După 24—48 de ore de incubație la 37° se prelevează coloniile izolate, prin tehnica aspirației sau fragmentării coloanei de geloză într-o placă Petri sterilă. O parte a coloniei se folosește pentru controlul prin frotiu colorat cu Gram și cealaltă parte pentru însămînțare în bulion anaerob V. F., spre a obține simultan cultura pură și elaborarea de toxină.
Pentru identificare se vor studia caracterele morfologice, biochimice și de cultură și se va identifica tipul de toxină secretată prin centrifugarea a 5 ml cultură în bulion V. F. și inocularea supernatantului amestecat cu antitoxină la animalele sensibile. Din cultura în bulion V. F. se poate efectua și testarea sensibilității la antibiotice.

— Se eliberează buletinul de analiză în care se indică rezultatul examenului direct al produsului patologic și caracteristicile morfologice, biochimice și de toxigenitate ale tulpinii sau tulpinilor de microbi sporulați anaerobi izolate. Eventual se indică și spectrul de sensibilitate la antibiotice.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR CU MICROBI ANAEROBI NESPORULAŢI

Schema de diagnostic B

Produse patologice **: exsudat purulent, sînge, exsudat pleural, exsudat purulent din sinusul nazal şi maxilar, exsudat rinofaringian, exsudat amigdalian în angine, exsudat seropurulent al mucoasei uterine etc.**

— Se efectuează frotiuri pe lame curate şi degresate din produsele patologice care se colorează cu Gram şi albastru de metilen.

— Se fac examene microscopice directe între lamă şi lamelă şi eventual pe cîmp întunecat.

— Se efectuează hemocultură în bulion glucozat cu ser sau ascită anaerob.

— Se efectuează o suspensie în 3 ml soluţie clorurosodică $8{,}5^{0}/_{00}$ sterilă, din produsul patologic şi se efectuează următoarele însămînţări cu pipeta Pasteur :

↓ 2 tuburi cu bulion glucozat anaerob + ser

↓ 2 tuburi bulion-ficat anaerob

↓ 2 tuburi cu geloză glucozată Veillon + sînge defibrinat 10 %

↓ 2 tuburi cu bulion Brewer anaerob

— Se controlează macroscopic pentru turbiditate hemocultura dacă s-a efectuat şi se fac subculturi prin epuizarea ansei pe o placă cu geloză-sînge Zeissler, care se incubează anaerob. Coloniile izolate sînt studiate ulterior prin caracterele morfologice, biochimice şi de patogenitate la animalele de laborator.

— Se controlează macroscopic tuburile cu mediile lichide şi cele cu geloza Veillon şi se fac subculturi prin epuizarea ansei pe 2 plăci geloză-sînge Zeissler, care se incubează într-un recipient din care s-a scos aerul. Coloniile izolate sînt identificate pe baza caracterelor morfologice, biochimice şi de patogenitate la animal.

— Din coloniile izolate se pot face subculturi în bulion-ficat anaerob în vederea stabilirii spectrului de sensibilitate la antibiotice.

— Se eliberează buletinul de analiză în care se indică rezultatele examenului direct al produsului patologic şi caracteristicile morfologice, biochimice şi de patogenitate ale tulpinii izolate în cultură pură. Eventual se indică şi spectrul de sensibilitate la antibiotice.

BIBLIOGRAFIE

ALIEV A. N. — An attempt at a physiological analysis of the process of intoxication of the organism in cases of anaerobic infections, *Dokl. Akad. Nauk.* (*Mosk.*), 1956, vol. 111, p. 1 147.

ALTMEIER W. A. — The bacteriology of war wounds, *Int. Abstr. Surg.*, 1949, vol. 75, p. 518.

ALTMEIER W. A., GIBBS W. E. — Bacterial flora of fresh accidental wounds, *Surg. Gynec. Obst.*, 1944, vol. 78, p.164.

BITTNER J. — Cultivarea „aerobă" a anaerobilor stricţi, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1961, nr. 4, p. 297—316.

BITTNER J., VOINESCO VIORICA, ANTOHI S.— La sensibilité aux antibiotiques des anaérobes du genre Clostridium determinée „in vitro" par diffusion circulaire en gelose, *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 1961, vol. 20, p. 63, 76.

BOWIE J. H. — Gas gangrene after injection, *Lancet*, 1956, noiembrie, 10, p. 997—998.

BREWSTER S. E. — Gas gangrene following an intramuscular injection of concentrated liver extract, *J. Amer. med. Ass.*, 1962, vol. 181, p. 901—903.

BUROVA A. E. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase J. G. Sinai şi O.G. Birgher (traducere din limba rusă), Ed. de Stat pentru literatura ştiinţifică, Bucureşti, 1952, p. 229—252 şi 252—254.

BYCHENKO B. D., MATEEV K. J., BULATOVA T. J., DAVYDOVA N. Y. — Cercetarea serologică a antigenelor de grup la *Cl. perfringens* prin metoda reacţiei de precipitare, *Z. Mikrobiol.*, (*Mosk.*), 1959, vol. 30, p. 81.

DUMAS G. — Bactériologie médicale, Ed. Flammarion, Paris, 1951, p. 641—681.

DALGAACO-MIKKELSEN S., KARLSHOF K., SZABO L. — The significance of hyaluronidase for the infectiosity of Cl. welchii, *Acta Path. microbiol. scand.*, 1950.

FREDETTE V., AUGER A., FORGET A. — Anaerobic flora of chronic nasal sinusitis in adults, *Cand. Med. J.*, 1961, vol. 84, p. 164—165.

FROBISHER M. — Fundamentals of bacteriology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Philadelphia, 1959, p. 511—530.

GASTINEL P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Ed. Masson, Paris, 1957, p. 796—802 ; 802—818, 819—828 ; 828—865 ; 865—892.

HALLMANN L. — Bakteriologie und Serologie, ed. a 2-a, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1955, p. 310—346.

KOMKOVA O. A. — Diagnosticarea accelerată a agenţilor cauzali ai gangrenei gazoase prin metode noi, *Ž. Mikrobiol.* (*Mosk.*), 1958, nr. 5, p. 40—44.

KOONS T. A., BOYDEN G. M. — Gas gangrene from parenteral injection, *J. Amer. med. Ass.*, 1961, vol. 175, ianuarie 7, p. 46—47.

MC. LENNAN D. J. — The histotoxic clostridial infections of man, *Bact. Rev.*, 1962, vol. 26, nr. 2, p. 177—276.

LUŞTREA V., REICHRATH S., ALEXANDRESCU N., VICOL A., TOMICI M. — Consideraţii asupra unor cazuri de botulism, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1962, nr. 6, p. 535—540.

MACKIE T. J., Mc. CARTNEY J. E. — Handbook of practical bacteriology, ed. a 9-a, Ed. Livingstone, Edinburgh, 1956, p. 500—524.

NESTORESCU N. — Bacteriologie medicală (sub. red. prof. N. Nestorescu), Ed. medicală, Bucureşti, 1961, p. 658—702 ; 658—659 ; 659—664 ; 664—697 ; 697—702.

PREVOST A. R. — L'anaérobe, cet inconnu. *Bull. Ass. méd. Canada*, 1948, vol. 77, p. 1—11.

RAMOND L. — Gangrène gazeuse consecutive à une injection intramusculaire d'un médicament antiasthmatique adrénaliné, *Bull. Soc. Hôp. Paris*, 1943, vol. 58, p. 421.

REED G. B. — Bacterial and mycotic infections of man, ed. a 2-a, sub red. Dubos R. I. Ed. Lippincott, Philadelphia, 1952, p. 389—408.

SĂSĂRMAN AL. — Dispozitiv simplu pentru realizarea anaerobiozei în cadrul unui procedeu mixt, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1961, nr. 2, p. 177—182.

SĂSĂRMAN AL., HORODNICEANU THEA, SOLOMON EUGENIA, MILOŞESCU P., DOSPINA MARIA — Contribuţii la studiul metodelor de izolare a *Cl. perfringens*. Nota a II-a. Izolarea *Cl. perfringens* din alimente (mezeluri) folosind tehnica de îmbogăţire la 46—47°, *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1961, nr. 5, p. 421—424.

SCHNEIERSON S. S. — In vitro effects of penicilin upon toxins of Cl. welchii type, *Amer. J. Immun.*, 1947, vol. 56, p. 307.

SMIRNOV S. G. — Măsurarea rH_2 în culturile bacteriene în stadiu de dezvoltare cu ajutorul unui element din electrozi de platină şi stibiu, *Mikrobiologija*, 1960, vol. 29, fasc. 1. Din „Probl. de Path. Inf." din lit. sovietică de specialitate, Acad. R.P.R., Institutul de studii Romîno-sovietic, 1960, nr. 4, p. 32—39.

SMITH L. — Clostridia in gas gangrene, *Bact. Rev.*, 1949, vol. 13, p. 233.

STITT E. R., CLOUGH P. W., BRANHAM S. E. — Practical bacteriology, hematology and parastiology, ed. a 10-a, Ed. Blakiston, New-York, 1948, p. 62—74.

THOMPSON R. V. — Microbiology and epidemiology, ed. a 4-a, Ed. Saunders, Londra, 1958, p. 430—437.

TONGE J. L. — Gas gangrene following injection of adrenalin in oil, *Med., J. Aust.*, 1957, decembrie 28, p. 936—938.

VOLKOVA Z. M., ZELEVINSKAIA S. A. — Proprietăţile imunizante ale anatoxinei *Cl. perfringens*, purificată, concentrată şi adsorbită pe hidroxid de aluminiu. *Ž. Microbiol.* (*Mosk.*), 1957, vol. 28, p. 77.

WEINBERG M., NATIVELLE R., PRÉVOT A. — Les microbes anaérobes, Ed. Masson, Paris, 1937.

WHITBY L., HYNES M. — Medical bacteriology, ediţia 6-a, Ed. Churchill, Londra, 1956, p. 303—326.

WILDFÜHR G. — Medizinische Mikrobiologie, immunologie und epidemiologie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1959, partea I, p. 307—333.

ZINSSER H. — Textbook of bacteriology, ed. a 11-a, Ed. Appleton-Century-Crofts, New-York, 1957, p. 477—492; 493—499; 500—504.

Dr. DĂNCESCU PAUL

PARAZITOLOGIE

INTRODUCERE

Paraziţii animali sînt vieţuitoare care folosesc ca biotop şi sursă de hrană alte fiinţe, aparţinînd altor specii. Fenomenul de parazitism se bazează pe două elemente : primul este fiinţa parazită, al doilea este gazda sau fiinţa care suportă parazitul. De cele mai multe ori, relaţia dintre parazit şi gazdă se manifestă printr-o formă de boală. Dintre bolile parazitare, unele se impun prin gravitatea lor clinică. Malaria, leishmanioza viscerală, multe helmintoze sînt cunoscute ca un adevărat flagel al omenirii. Alte boli parazitare, deşi sînt suportate mai uşor de organismul uman, reprezintă prin incidenţa lor crescută şi prin cronicitate o problemă de sănătate publică tot atît de importantă. Astfel, un şir întreg de paraziţi care iniţial au fost consideraţi de mică importanţă se bucură astăzi de o atenţie deosebită. Este suficient să se amintească giardia, parazit multă vreme desconsiderat în medicină şi care, pe zi ce trece, ocupă locul care i se cuvine în etiologia unor boli ale tubului digestiv.

Majoritatea paraziţilor se caracterizează în evoluţia lor printr-un circuit ciclic. Unii paraziţi se transmit prin vectori, alţii necesită în evoluţie una sau mai multe gazde intermediare. De un deosebit interes în diagnosticul parazitozelor sînt cunoaşterea ciclului biologic al agentului etiologic, localizarea şi căile de eliminare a paraziţilor sau elementelor parazitare din corpul omului. Diagnosticul constă în identificarea paraziţilor, ouălor sau chisturilor şi în decelarea modificărilor imunobiologice, pe care paraziţii le determină în organismul gazdei. Metodele de diagnostic ale bolilor parazitare sînt determinate de momentul în care este surprinsă o boală, precum şi de caracteristicile biologice ale fiecărei specii de parazit în parte. Majoritatea parazitozelor au manifestări clinice necaracteristice, iar precizarea diagnosticului se bazează în primul rînd pe metode de laborator.

Deşi mulţi dintre paraziţi şi multe boli parazitare au fost cunoscute de om încă din antichitate, parazitologia s-a conturat destul de tîrziu ca ştiinţă, rămînînd pînă de curînd în urma altor ramuri ale medicinei. Este un merit deosebit al savanţilor sovietici că au aşezat parazitologia modernă pe temelii noi, că i-au dat un nou conţinut teoretic şi practic. Nevoile materiale ale societăţii socialiste şi gîndirea materialist-dialectică au introdus în parazitologie o orientare nouă, care a revoluţionat cursul lent al acestei ştiinţe. Învăţătura acad. Pavlovski asupra focalităţii naturale a bolilor transmisibile, teoria dehelmintizării enunţată şi amplificată de acad. Skriabin, interpretarea ecologică a relaţiilor dintre parazit şi gazdă au deschis în parazitologie perspective teoretice multilaterale, însoţite de o largă aplicare practică.

Şcoala romînească de parazitologie a cunoscut în trecut savanţi şi profesori progresişti. Impunîndu-se prin cercetări ştiinţifice de valoare mondială şi prin muncă de combatere a parazitozelor, Zotta, Leon, Ciurea şi alţii au pus bazele parazitologiei în ţara noastră.

De o deosebită importanţă este crearea în anii regimului de democraţie populară, a unei reţele organizate antimalarice şi antihelmintice. Faza de eradicare a malariei sau de devastaţie a anchilostomiazei în care ne aflăm astăzi a fost posibilă numai în noile condiţii în care se desfăşoară activitatea medicală. În prezent, şcoala noastră de parazitologie, condusă de acad. prof. M. Ciucă, prof. Gh. Lupaşcu, membru corespondent al Academiei R.P.R., prof. E. Ungureanu, prof. V. Niţulescu, obţine mereu importante realizări.

În instituţii superioare şi pe teren se desfăşoară sub ochii noştri o vie activitate ştiinţifică, o muncă rodnică de combatere a bolilor parazitare.

METODE GENERALE PENTRU DIAGNOSTICUL PARAZITOZELOR ŞI IDENTIFICAREA PARAZIŢILOR

SÎNGELE

Paraziţi decelabili în sînge şi în organele hematopoetice.

Protozoare	*Trypanosoma sp.*
	Leishmania donovani
	Trichomonas vaginalis[1]
	Plasmodium vivax
	P. falciparum
	P. malariae
	Toxoplasma gondii[1]
Nemathelminţi	*Trichinella spiralis* larve[1]
	Microfilarii

Paraziţii în sînge se examinează în preparatul proaspăt între lamă şi lamelă, în preparate colorate pe lamă sau după metode de concentrare.

Pentru examenul sîngelui proaspăt se recoltează o picătură de sînge din pulpa degetului şi se examinează microscopic între lamă şi lamelă.

Preparatele colorate au avantajul că ne dau detalii de fineţe, se pot examina cu obiectivul cu imersie şi se păstrează vreme îndelungată.

Frotiul în strat subţire. Pentru *recoltare* sînt necesare lame curate şi degresate, o lamă şlefuită pentru întins frotiul, ace de seringă sterilizate, alcool şi vată. Se aleg numai lame de sticlă intacte, fără pete, zgîrieturi sau opacificări. Lamele se spală cu apă şi săpun (se indică înlocuirea săpunului cu sodă), se clătesc de mai multe ori cu apă, se şterg şi se spală cu alcool. Din alcool, lamele se şterg cu o cîrpă curată şi se flambează.

Lamele se manevrează numai pe laturile lor. Recoltarea sîngelui se face din pulpa degetului inelar sau median; în practica curentă s-a renunţat la recoltarea sîngelui din lobulul urechii. Mîna de la care se recoltează sîngele trebuie să fie curată. Pulpa degetului se şterge bine cu alcool şi se usucă apoi cu vată uscată. După înţeparea cu acul, prima picătură de sînge se îndepărtează cu vată uscată. Din picătura următoare se face un frotiu cu marginea unei lame şlefuite, apoi frotiul se usucă repede prin agitarea lamei. Cu un creion negru obişnuit (nu chimic) se notează pe lamă numele bolnavului sau numărul pentru identificare.

Fixarea frotiurilor pe lame se obţine cu alcool etilic, 5—10 minute, alcool metilic, 3—5 minute sau cu soluţia May-Grünwald, 5 minute. Lamele se aşază cu faţa în sus, se acoperă cu fixator, iar deasupra se pune un capac de cutie Petri.

Colorarea necesită cutii Laveran, pipete, apă distilată neutră şi colorant. Pentru colorare se folosesc: metoda May-Grünwald-Giemsa, metoda Leishman, R18 Ungureanu şi altele.

Metoda May-Grünwald-Giemsa fixează şi colorează preparatul în acelaşi timp. Se acoperă frotiul de sînge cu soluţia May-Grünwald şi se lasă 3—5 minute pentru fixare. Se adaugă aceeaşi cantitate de apă distilată în picături, se amestecă uşor înclinînd lama şi se lasă, în funcţie de diferite tehnici, timp de 1 minut sau timp dublu fixării, adică cel puţin 6 minute. Se varsă lichidul de pe lamă şi se introduce fără spălare, în baia de colorant Giemsa, preparată extemporaneu din apă distilată în soluţie Giemsa cîte 3 picături pentru fiecare 2 ml apă. După 20—40 de minute, lamele se scot şi frotiul se spală sub un curent de apă. După uscare, frotiul este examinat la microscop.

---

[1] Aceşti paraziţi se găsesc rareori, excepţional sau accidental, în sînge şi în organele hematopoetice.

Examinarea se face cu obiectivul cu imersie şi ocular 7 ×. Condensatorul microscopului trebuie ridicat, iar diafragmul irian deasupra oglinzii se deschide.

Metoda Leishman ne dă o colorare rapidă. Peste frotiu se toarnă 10—15 picături de colorant. După 30 de secunde se adaugă o cantitate egală de apă distilată, se amestecă şi se menţine 10 minute, după care se spală lama sub un curent de apă.

Picătura groasă se recoltează tot din pulpa degetului. Se iau pe suprafaţa lamei, în treimea externă, de o parte şi de alta, cîte 2—3 picături de sînge. Cu un ac sau cu colţul altei lame de sticlă se omogenizează sîngele pentru ca să se obţină un strat uniform, defibrinat, de 1 cm diametru. După recoltare, lamele se aşază sub un capac de cutie Petri, la adăpost de soare, praf şi căldură, pînă se usucă. Picătura groasă nu se fixează.

Hemoliza se face în apă în cutii de colorare sau acoperind cu apă suprafaţa unei lame. Timpul de hemoliză este variabil. Lamele se menţin în apă pînă cînd picătura devine alb-cenuşie. Picăturile groase proaspete hemolizează repede. Pentru a obţine hemoliza materialului mai vechi se adaugă în apă acid acetic glacial 5%, după care lamele se spală de mai multe ori cu apă.

Colorarea se face direct în baia cu soluţie Giemsa diluată 3 picături în 2 ml apă. După colorare, picătura groasă se spală cu atenţie sub un curent slab de apă.

Metodele de concentrare se folosesc pentru decelarea larvelor de nematode din sîngele circulant. Reacţia Staubli este descrisă la trichinoză.

Reacţiile de floculare şi reacţiile serologice îşi au aplicaţie într-un număr redus de boli parazitare, ca leishmanioza, malaria, toxoplasmoza, hidatidoza, trichinoza şi altele. Reacţiile sînt descrise la capitolele corespunzătoare.

Culturi de paraziţi şi inoculări la animale receptive se folosesc în diagnosticul bolilor parazitare din grupa protozoarelor sanguine, ca leishmaniozele, tripanosomiazele, toxoplasmoza şi altele.

Tabloul sanguin în parazitoze variază în legătură cu grupa din care face parte agentul etiologic, cu forma pe care o îmbracă boala. Modificările sîngelui sînt descrise la fiecare boală.

De un interes special este eozinofilia generală, fenomen constant în evoluţia helmintozelor. Nivelul eozinofiliei nu este fix ; el variază în funcţie de mai mulţi factori, între care momentul bolii, specia şi numărul de paraziţi sînt cei mai importanţi. Nivelul eozinofiliei descrie în timp o curbă de forma unui clopot. După infestare urmează o perioadă de latenţă, în care formula leucocitară nu suferă modificări. Urmează apoi o perioadă de creştere rapidă a numărului eozinofilelor. Durata intervalului de maximum este variabilă. Ulterior, numărul eozinofilelor scade, la început rapid, apoi din ce în ce mai lent, stabilindu-se aparent la un nivel peste normal care durează foarte mult, mergînd pînă la mai mulţi ani. Curba descrisă în timp este deci asimetrică. Durata perioadei de latenţă, momentul apariţiei eozinofiliei maxime şi durata descreşterii sînt determinate de specia de helmint, deci sînt caracteristice fiecărei boli în parte. Nivelul la care se ridică numărul de eozinofile este determinat de densitatea parazitară. Acest nivel maxim nu creşte însă mereu cu numărul de paraziţi, ci trece el însuşi printr-un maxim, apoi descreşte, fapt care explică fenomenul paradoxal din trichinoză, cînd în doze infestante peste o anumită limită nu apare o hipereozinofilie.

Eozinofiliile parazitare evoluează în mod constant potrivit curbei descrise mai sus, reflectînd permanenţa bolii. Se consideră că nu sînt influenţate de ACTH în probele comune sau cortizon şi medicamentele antihelmintice active determină o exacerbare trecătoare şi o scădere ulterioară mai rapidă. După eliminarea helminţilor din organism, curba evoluează mai departe printr-un lizis caracteristic. Formula leucocitară nu ne poate da deci indicaţii imediate asupra eficienţei unui tratament antihelmintic.

SPUTA

Paraziţi decelabili în spută.

Protozoare	*Entamoeba sp.* [1] *Trichomonas bucalis* [1]
Plathelminţi	*Echinococcus granulosus* [1], elemente din hidatidă *Paragonimus ringeri*, ouă şi adulţi [1]
Nemathelminţi	*Ascaris lumbricoides*, larve [1] *Strongiloides stercoralis*, larve [1] *Ancylostoma duodenale*, larve [1]

Examenul sputei pentru decelarea paraziţilor sau a elementelor parazitare se face prin metoda examenului direct sau prin tehnici de îmbogăţire. Se recoltează spută sau conţinutul unei vomici. Protozoarele sînt rareori întîlnite în expectoraţie. De asemenea, rareori pot să fie întîlnite larve sau elemente parazitare aparţinînd helminţilor. În mod curent, prin examenul expectoraţiei se diagnostichează paragonimiaza, deoarece ouăle trematodului *P. ringeri* se elimină pe această cale.

---

[1] Se găsesc foarte rar.

URINA

Paraziţi decelabili în urină.

Protozoare	*Entamoeba sp.* [1]
	Trichomonas vaginalis [1]
Plathelminţi	*Schistosoma haematobium*, ouă
	Echinococcus granulosus, elemente din hidatidă [1]
Nemathelminţi	*Enterobius vermicularis*, ouă [1]

Se examinează sedimentul urinar. Elementele parazitare se întîlnesc rareori în urină. În mod obişnuit, pe cale urinară se elimină numai ouăle de *Schistosoma haematobium*.

SECREŢIA VAGINALĂ

Paraziţi decelabili în vagin.

Protozoare	*Trichomonas vaginalis*
Nemathelminţi	*Enterobius vermicularis* [2], ouă.

Recoltarea, examenul direct al secreţiei vaginale, colorarea preparatelor, culturile şi inoculările la animale de laborator sînt descrise la capitolul „Tricomonază".

Femelele de *E. vermicularis* pot să ajungă în regiunea vulvară după părăsirea tractului digestiv în scopul depunerii ouălor.

SUCURILE DIGESTIVE ŞI SCAUNUL

Paraziţi decelabili în lichidul duodenal.

Protozoare	*Giardia intestinalis*, trofozoiţi
	Entamoeba sp., trofozoiţi
Plathelminţi	*Fasciola hepatica*, ouă
	Dicrocelium dendriticum, ouă
	Opistorchis felineus, ouă
	Clonorchis sinensis, ouă
	Echinococcus granulosus, elemente de hidatidă
Nemathelminţi	*Strongiloides stercoralis*, larve.

Recoltarea sucului duodenal se face prin tubaj duodenal.

Se examinează produsul la microscop între lamă şi lamelă, după centrifugare. Examenul lichidului duodenal este preţios pentru precizarea în special a diagnosticului anumitor parazitoze.

Paraziţi decelabili în materiile fecale.

Protozoare	*Entamoeba dysenteriae*, trofozoiţi şi chisturi
	E. coli, trofozoiţi şi chisturi
	E. dispar, trofozoiţi şi chisturi
	E. hartmani, trofozoiţi şi chisturi
	Endolimax nana, trofozoiţi şi chisturi
	Pseudolimax bütschlii, trofozoiţi şi chisturi
	Dientamoeba fragilis, trofozoiţi şi chisturi
	Giardia intestinalis, trofozoiţi şi chisturi
	Trichomonas intestinalis, trofozoiţi
	Chilomastix mesnili, trofozoiţi şi chisturi
	Isospora belli, oochişti
	I. hominis, oochişti
	Eimeria gubleri, oochişti
	Balantidium coli, trofozoiţi şi chisturi
Plathelminţi	*Fasciola hepatica*, ouă
	Fasciolopsis buski, ouă
	Dicrocoelium dendriticum, ouă
	Opistorchis felineus, ouă
	Clonorchis sinensis, ouă
	Paragonimus ringeri, ouă
	Schistosoma mansoni, ouă
	S. Japonicum, ouă
	S. haematobium, ouă
	Taenia saginata, proglote şi embriofori
	T. solium, lanţ de proglote, embriofori
	Echinococcus granulosus, elemente de hidatidă
	Hymenolepis nana, ouă
	H. diminuta, ouă
	Dipilidium caninum, proglote şi capsule ovifere
	Diphyllobothrium latum, lanţ de proglote şi ouă
Nemathelminţi	*Trichinella spiralis*, adulţi
	Trichuris trichiura, ouă
	Strongiloides stercoralis, larve
	Ancylostoma duodenale, ouă
	Necator americanus, ouă
	Trychostrongilus sp., ouă
	Enterobius vermicularis, adulţi şi ouă
	Ascaris lumbricoides, adulţi şi ouă
Artropode	larve de brahicere
	Tiroglyphus sp., adult pseudoparazit.

Analiza materiilor fecale este un mijloc de bază în diagnosticul multor parazitoze. Rezultatele analizelor coprologice depind în mare măsură de aplicarea normelor de recoltare şi de respectarea riguroasă a tehnicilor indicate.

Recoltarea materialului de examinat trebuie potrivită scopului cercetării. Pentru macroelemente, ca fragmente de tenii sau paraziţi întregi, ascarizi, oxiuri ş.a., materialul se recoltează în vase de sticlă (cristalizoare cu capac şlefuit sau borcane), de mărime potrivită, în formol 5% (cestode) sau alcool 70% (nematode), sau în ser fiziologic. Pentru cercetarea unor helminţi intestinali de talie mică sau a părţii superioare a teniilor mari, după aplicarea unor tratamente se recoltează scaunul în întregime, în condiţii asemănătoare.

---

[1] Se găsesc foarte rar.
[2] Se găsesc excepţional.

În anumite cazuri, cum este investigarea oxiurozei, recoltarea se face din jurul anusului, conform metodei descrise la capitolul „Oxiuroza". În mod obișnuit, în scopul decelării unor elemente microscopice, ca chisturi, ouă sau larve, se prelevează un fragment din scaunul neamestecat cu urină.

Recoltarea se face în flacoane sau cutii de sticlă sau în cutii de bachelită spălate, sterilizate și perfect uscate (fig. 382). Se ia cu o linguriță de metal sau sticlă din diferite locuri ale scaunului o cantitate de fecale de mărimea unei alune sau nuci. Tuburile de recoltă din sticlă se ambalează în tuburi de metal, pentru ca să fie ferite de lovituri. În nici un caz, recoltarea nu se face în hîrtie sau în cutii de chibrituri, ambalaje care permit ca materialul posibil infecțios să difuzeze în afară. Pentru examene speciale, ca cercetarea trofozoiților de protozoare, recoltarea se face în condiții speciale, eventual în urma administrării unui purgativ salin, conform metodei arătate la capitolul „Amibiază". La orice recoltare de material coprologic trebuie să se aibă grijă ca rezultatul final al examenului să corespundă bolnavului.

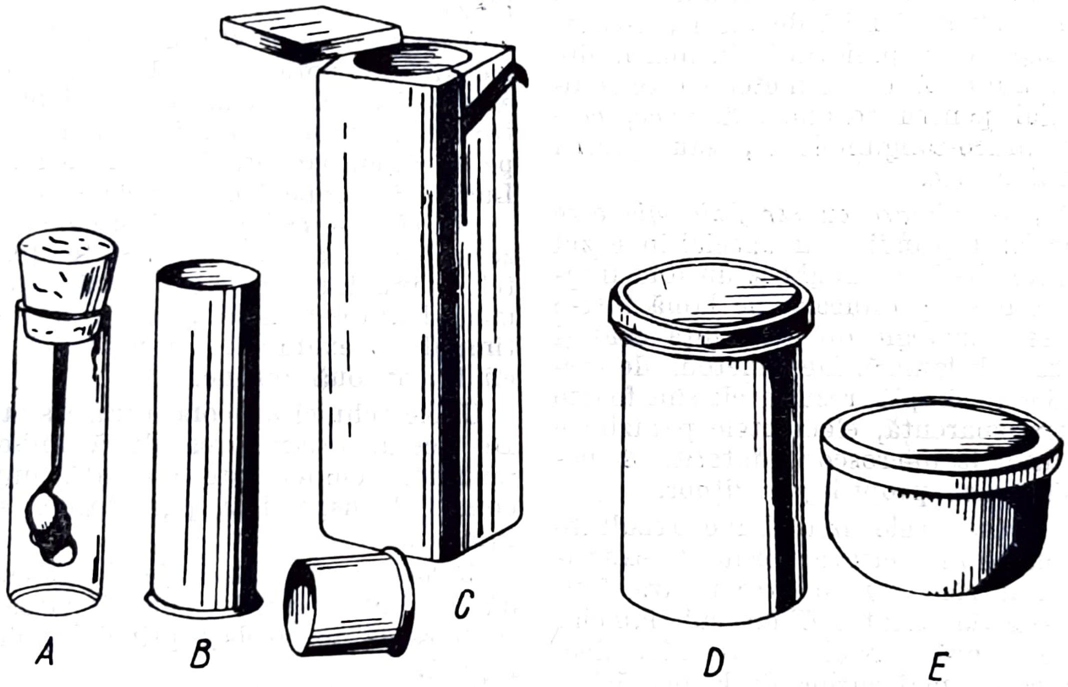


Fig. 382. — Tuburi de recoltare pentru materii fecale.

A, *B* și *C* — garnitura completă; *A* — tub de sticlă prevăzut cu dop de plută și linguriță de metal; *B* — tub de metal în care se introduce tubul de sticlă; *C* — cutie de lemn prevăzută cu căpăcel fixat cu lamă metalică; *D* și *E* — tuburi de recoltare din bachelită (Georgescu, Steinbach, Simionescu, Belchiță, 1956).

De aceea trebuie să ne asigurăm, în primul rînd că proba provine de la persoana indicată pentru analiză, iar în al doilea rînd să notăm imediat pe vasul cu fecale numele sau numărul corespunzător persoanei.

Examenul macroscopic este deseori neglijat. Cercetarea paraziților nu se face în flaconul sau cutia în care s-a recoltat proba de fecale. Pentru un examen corect sînt necesare un cristalizor, cutii Petri, o baghetă de sticlă, ser fiziologic, o sursă de apă curentă și un fond de examinare alb și negru, realizat prin hîrtie așezată pe masa de lucru. Materiile consistente se diluează în ser fiziologic și se examinează cu ochiul liber sau cu lupa de mînă, ajutîndu-ne de o baghetă de sticlă. Pentru a separa paraziții sau pentru a identifica helminți mici ca *Trichinella spiralis* sau *Hymenolepis nana* se diluează masa de fecale într-un cristalizor, paraziții sedimentează, iar lichidul se decantează, operația repetîndu-se de mai multe ori. Viermii intestinali, avînd culoarea albicioasă, se examinează foarte bine prin contrast pe fond negru. Pentru a masca mirosul neplăcut se adaugă cîteva picături de nitrobenzen sau formol 20%.

Examenul microscopic se poate face prin mai multe metode directe și de concentrare. Microscopic se pot decela trofozoiți și chisturi de protozoare și embriofori, ouă și larve de helminți.

Metodele directe de cercetare necesită ca material lame de sticlă curate, lamele, baghete de sticlă, o ansă metalică, sticle cu ser fiziologic, soluție Lugol, soluție de eozină și de roșu neutru și un microscop cu obiectiv 3 și 7.

Examenul direct constă în examinarea sub lamelă a unei cantități mici de fecale, așezată pe lamă cu baghetă și prelevată din mai multe părți ale scaunului. Această metodă este indicată în special pentru scaunele diareice, cele cu flocoane muco-sanguinolente, sau pentru scaunele semiformate.

Examenul prin diluare cu ser fiziologic este în general preferat și indicat în special în cazul unui scaun tare. Se ia cu bagheta un mic fragment de materii și se diluează pe lamă într-o picătură de ser fiziologic de preferință cald și se examinează sub lamelă. Deși metoda de cercetare directă este simplă, rezultatele sînt foarte bune. Prin transparență, elementele parazitare se identifică ușor la microscop, datorită structurii sau mișcărilor proprii paraziților.

Pentru a obține cele mai bune rezultate trebuie respectate însă cîteva norme de examinare. În primul rînd nu se examinează fără lamelă sau pelicula uscată. Chiar sub lamelă, preparatul se usucă destul de repede, deci trebuie cercetat cît mai curînd de la pregătire. Se folosesc în general lamele mari de 22/22 mm. Trebuie să se aibă în vedere ca marginile lamelei să fie înăuntrul lamei de sticlă. O bună examinare necesită un amestec uniform în strat subțire, transparent și omogen. Lamela nu trebuie să stea înclinată sau să plutească peste un strat gros de lichid. Se examinează metodic toată suprafața lamei. De aceea este bine să folosim un microscop cu platina pătrată cu cursori. Examinarea se face pe îndelete, cu obiectiv 3 (10 ×), aducînd în lunetă obiectivul 7 (40 ×) ori de cîte ori apare în cîmpul microscopului un element suspect. Pentru chisturi de amibe și flagelate și pentru oochiști de coccidii se indică de la început examinarea cu obiectivul 7.

În general se recomandă ca la examenul coprologic, condensatorul microscopului să fie coborît. Este însă preferabil să se ridice condensatorul, închizînd în același timp diafragmul irian deasupra oglinzii.

Concluzia examenului se trage după ce s-au cercetat cel puțin două preparate. Se consideră că examenul direct dă rezultate bune și sigure cînd există peste 500 de elemente parazitare (ouă) la 1 g materii fecale. Între 300 și 500 de ouă/g, rezultatul examenului direct este problematic, iar sub 300, metoda directă nu este eficientă și se impune folosirea unor tehnici de îmbogățire.

Metodele de colorare pe lamă cu eozină și roșu neutru sînt menționate la capitolul „Amibiază''.

Examenul cu soluție Lugol dublu (1 g iod, 2 g iodură de potasiu și 100 ml apă distilată) este indicat în special pentru identificarea chisturilor de protozoare. Diluția fecalelor se face pe lamă, cu baghete, în 1—2 picături de soluție Lugol. Se acoperă cu lamela și se examinează.

Metodele de îmbogățire sau concentrare se bazează pe diferența de densitate dintre elementele parazitare (chisturi, ouă, embriofori) și mediul ambiant lichid. Aceste metode scurtează timpul de examinare și ușurează diagnosticul cînd sînt ouă puține.

Unele tehnici de concentrare sînt laborioase. De aceea, examinarea după îmbogățire prin anumite tehnici este indicată numai pentru controlul suspecților, purtătorilor și după tratament.

Metoda sedimentării simple, repetate, în apă dă rezultate parțiale. Centrifugarea fracționată se bazează pe același principiu, dar este mai rapidă.

Metoda Willis Hung se bazează pe principiul hidrostatic. Materiale necesare sînt lame, lamele, baghete de sticlă, capace de pahare Borrel, soluție suprasaturată de clorură de sodiu sau sulfat de magneziu în apă distilată. În capace de pahare Borrel înalte de 2—3 cm se pune cu bagheta o cantitate de fecale cît o alună mică. Se toarnă puțină soluție de sare și se omogenizează bine fecalele, iar apoi, treptat, se umple recipientul și se amestecă. Deasupra lichidului se așază o lamelă, care va pluti liberă. Ouăle ușoare se ridică în sus și aderă de lamelă. După 30 de minute, cu o pensă desfăcută se prinde lamela de două margini, se ridică și se așază pe o lamă. Preparatul se examinează la microscop.

Este bine să nu depășim 45 de minute de plutire a lamelei, deoarece unele ouă ridicate pot să se îmbibe cu soluție de sare și cad la fund. Metoda Willis dă rezultate foarte bune cînd în fecale sînt ouă ușoare, ca cele de *ascarizi*, *oxiuri*, *anchilostoma*, *himenolepis* şi uneori şi de *tricocefal*. Ouăle operculate pot uneori să se deceleze prin această metodă, dar, deşi aceste ouă se ridică iniţial sub lamelă, cad totuşi repede la fund, din cauza pătrunderii soluţiei saturate de sare prin opercul în interiorul lor.

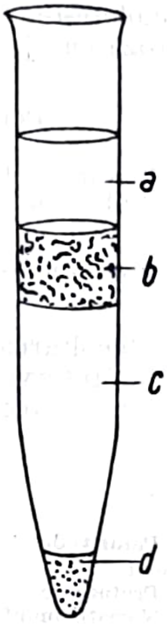


Fig. 383. — Eprubetă de centrifugă cu produsul final (tehnica de concentrare Telemann-Langeron).

a — eter cu grăsimi; b — depozit cu elemente uşoare; c — strat de acid clorhidric; d — depozit cu elemente grele (Georgescu, Steinbach, Simionescu, Belchiţă, 1956).

Metoda Telemann-Langeron se bazează pe sedimentarea ouălor grele de helminţi prin centrifugare. Ca material sînt necesare lame, lamele, baghete de sticlă, sticle cu dop şlefuit de 30—50 ml, perle de sticlă, centrifugă cu eprubete, pipete Pasteur, soluţie de acid clorhidric 50%, eter. Se ia o cantitate de fecale cît o alună (1—2 g) cu bagheta şi se introduce în sticlă cu dop şlefuit împreună cu perle de sticlă. Se adaugă aproximativ 10 ml acid clorhidric (5 ml pentru 1 g fecale). Se închide sticla şi se omogenizează perfect cu ajutorul unui agitator. Acidul clorhidric are rolul să dizolve mucusul şi să emulsioneze şi să desprindă elementele parazitare din masa de proteine şi resturi din fecale. Se lasă în repaus 5 minute. Se adaugă o cantitate de 10 ml eter şi se agită din nou flaconul timp de 2—3 minute, avînd grijă să fixăm dopul rodat de gîtul flaconului pentru ca să nu fie împins afară cu violenţă de vaporii de eter sub presiune. Cantitatea de eter poate să fie adăugată sau în acelaşi flacon sau după decantarea părţii lichide a fecalelor diluate în acid. Eterul dizolvă grăsimile şi acizii graşi. Amestecul final se varsă în tuburi de centrifugă de mînă, se echilibrează şi se centrifughează timp de 3—5 minute. După centrifugare, conţinutul din tuburi se stratifică în patru părţi distincte (fig. 383): 1) deasupra se ridică eterul care a dizolvat grăsimile şi materiile colorante; culoarea este galbenă; 2) stratul următor subţire este format din detritusuri fine organice. Aici se pot găsi şi ouă uşoare, ca cele de ascarizi, oxiuri, anchilostoma şi eventual tricocefal; 3) stratul următor conţine acidul clorhidric; 4) ultimul strat reprezintă sedimentul de la fundul eprubetei, în care se găsesc detritusuri grele, particule vegetale, *chisturi de protozoare*, ouă de helminţi cu opercul ca cel de *fasciolă*, *botriocefal*, *dicrocel* şi embriofori de *tenii* şi eventual ouă de *tricocefal*.

Se desprind straturile superioare de pereţii eprubetei cu o ansă sau o baghetă fină şi se răstoarnă tubul de centrifugă dintr-o dată, pentru ca să se îndepărteze cele trei straturi superioare. Din depozitul rămas la fund se ia cu o pipetă Pasteur, se pune cîte o picătură pe lamă şi se acoperă cu o lamelă. Se examinează la microscop cu obiectivul 3 şi 7. Trebuie să se sublinieze faptul că în timpul examenelor coprologice *se îndepărtează obiectivul cu imersie* din revolverul microscopului. Fără să mai menţionăm posibilitatea unui accident regretabil ca intrarea cu acest obiectiv într-un preparat coprologic, dăunător prin compoziţie acestui obiectiv, trebuie să se ştie faptul că vaporii de eter, acizi, iod ş.a. atacă chiar de la distanţă obiectivul cu imersie.

Metoda de concentrare cu acid acetic este asemănătoare cu metoda Telemann-Langeron, cu deosebirea că în loc de acid clorhidric se foloseşte acid acetic 5%.

Măsurarea ouălor, chisturilor şi embrioforilor de paraziţi se face în preparatele microscopice folosind micrometrul ocular sau camera clară, etalonate în prealabil cu un micrometru obiectiv pentru un anumit sistem obiectiv-ocular.

Numărarea ouălor de helminţi se efectuează conform metodei Stoll. Se iau 5 g fecale, se diluează în soluţie decinormală de hidrat de sodiu cîte 15 ml pentru fiecare gram de fecale. Se amestecă cu perle de sticlă şi se agită bine pentru omogenizare. Se iau imediat cu o pipetă gradată 0,15 ml din amestec şi se face un preparat între lamă şi lamelă mare. Se numără toate ouăle din preparat la un microscop cu platina dreptunghiulară cu cursori. Se repetă întreaga operaţie, se calculează media numărului de ouă găsite, se înmulţeşte cu 100 şi se obţine numărul de ouă pentru 1 g fecale. Calculul are valabilitate numai pentru scaunul format; în cazul unui scaun păstos sau diareic, numărul real de ouă este de 2, respectiv 4 ori mai mare. Pentru înlesnirea numărării la microscop se poate folosi aparatul Zschucke, cu o cameră tip Bürker, efectuînd calculul indicat.

Metode coprologice speciale sînt folosite pentru diagnosticul oxiurozei, cînd ouăle nu se găsesc propriu-zis în scaun, ci în regiunea perianală. Tehnicile sînt descrise la capitolul „Oxiuroză".

Cauze de eroare în diagnosticul unei boli parazitare prin tehnicile coprologice microscopice sînt multiple. *Greşeli de tehnică* pot să ducă la falsul diagnostic pozitiv cînd ouă sau embriofori de paraziţi se găseau în prealabil pe sticlăria folosită, sticlărie care nu a fost bine curăţată. *Greşeli de orientare* pot să ducă la un fals diagnostic negativ în parazitoze, cînd nu se folosesc metodele corespunzătoare bolii, cînd se infirmă o afecţiune pe baza unui singur examen coprologic efectuat într-o perioadă negativă sau cînd numărul de paraziţi este foarte mic şi elementele parazitare scapă examenelor curente. *Greşeli de citire la microscop* privesc pe începătorii în munca de laborator. Uneori resturi alimentare sînt interpretate drept ouă de paraziţi sau invers. Nu trebuie să se uite că oul are o anumită mărime, formă şi structură care îi sînt caracteristice. În scaun se întîlnesc însă deseori particule care pot să fie uşor interpretate drept ouă, chisturi sau trofozoiţi. Astfel sînt grăunţele de polen, spori de ciuperci, celule vegetale, celule din tractusul digestiv şi altele.

Examene biologice. Tehnicile de coprocultură pentru protozoare intestinale şi inoculările la animale sensibile de laborator sînt descrise la capitolele speciale.

Infecţiozitatea materialului coprologic şi curăţirea obiectelor folosite. Scaunul reprezintă un produs posibil infecţios în orice moment. Paraziţii sau elementele parazitare microscopice din fecale nu sînt însă egali în privinţa pericolului pe care îl prezintă pentru om în timpul examenelor coprologice. Proglotele bătrîne de tenie şi oxiuri, scaunul cu embriofori de tenii, ouă de himenolepis şi chisturi de amibe sau flagelate si baghetele pentru diagnosticul oxiurozei reprezintă un material extrem de infestant. Ouăle de helminţi, care se transmit prin gazde intermediare nevertebrate, ca ouăle de trematode, botriocefal şi altele sau ouăle de nematode, care necesită o evoluţie stadială în sol, nu sînt infestante pentru om în momentul examenului coprologic imediat.

Resturile din materialul coprologic nefolosit în analize şi ambalajele nerecuperabile sau fără valoare se aruncă în foc la crematoriu sau într-o groapă ferită, în care se varsă dezinfectanţi puternici sau se ard cu petrol. Curăţirea şi sterilizarea materialului de laborator trebuie să se facă îndată după terminarea examenelor coprologice. Sticlăria se menţine timp de 24 de ore în amestecul oxidant sulfo-cromic, apoi se spală mult cu apă de robinet, se usucă şi se refoloseşte. Instrumentele de metal se sterilizează cu ajutorul temperaturilor înalte.

FORMAŢIUNI TUMORALE

Paraziţi decelabili în formaţiuni tumorale

Plathelminţi	*Echinococcus granulosus*, hidatide
	Taenia sp., cisticerci[1]
	Multiceps sp., cenur[1]
Nemathelminţi	*Wuchereria bancrofti*, adult
	Onchocerca volvulus, adult

Recoltarea materialului se obţine în urma unor intervenţii chirurgicale. Examenul pieselor se face în laborator.

PIELEA

Paraziţi decelabili în piele şi mucoase şi în ţesutul subcutanat

Protozoare	*Leishmania tropica*
Nemathelminţi	*Dracunculus medinensis*, adult
	Loa loa, adult
	Gongylonema pulchrum, adult[1]
	Toxocara sp., larve[1]
	Anchilostoma sp., larve[1]
Artropode	*Demodex folliculorum*
	Sarcoptes scabiei
	Sarcopsylla sp.

Metodele de recoltare şi examinare a leishmaniei sînt descrise la capitolul butonul de orient. Nemathelminţii se extrag operator sau prin deschiderile spontane ale tegumentelor şi se examinează în laborator.

MUŞCHII

Paraziţi decelabili în muşchi.

Plathelminţi	*Taenia sp.*, cisticerci[1]
Nemathelminţi	*Trichinella spiralis*, larve închistate.

Biopsia musculară este o metodă rareori folosită în diagnosticul parazitozelor şi greu acceptată de bolnav. Biopsia musculară în trichinoză este descrisă la capitolul corespunzător.

---

[1] Se găsesc rar.

BOLILE PARAZITARE ŞI PARAZIŢII OMULUI

ÎNCRENGĂTURA PROTOZOARE

Protozoarele alcătuiesc o încrengătură a regnului animal. Ele se caracterizează prin organismul lor unicelular. Unele protozoare au o structură a corpului foarte complicată, prezentînd organe de mişcare diferenţiate sau un aparat nuclear complex.

Protozoarele trăiesc libere sau parazite; cele parazite fac parte din următoarele patru clase: *rizopode*, *flagelate*, *sporozoare* şi *ciliate*, care se deosebesc între ele prin felul de înmulţire şi prin natura organelor de mişcare.

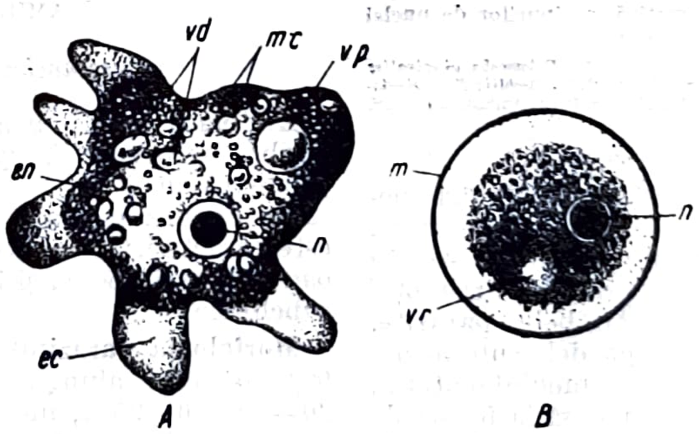


Fig. 384. — Amiba liberă.

A – trofozoit; B – chist; ec – ectoplasmă; en – endoplasmă; vd – vacuole digestive; vp – vacuolă pulsatilă; mc – microsomi; n – nucleu; m – membrană chistică; vr – vacuolă de rezervă (Georgescu, Steinbach, Simionescu, Belchiţă, 1956).

CLASA RIZOPODE

Rizopodele sînt protozoare cu corpul deformabil, nu au o membrană periferică şi emit pseudopode, cu ajutorul cărora se deplasează şi înglobează particulele alimentare. Se reproduc asexuat.

Rizopodele parazite ale omului fac parte din ordinul *amibienilor*. *Amibele* pot să îmbrace două forme: una vegetativă, sau trofozoit, şi una chistică.

În *forma vegetativă*, o amibă este alcătuită din *nucleu* şi *citoplasmă;* se mişcă şi se alimentează. Citoplasma este formată din două straturi: *ectoplasma*, situată către exterior, este hialină şi omogenă şi dă naştere pseudopodelor; în interiorul corpului se află *endoplasma*, care conţine *vacuole* şi *microsomi* sau granulaţii elementare. Vacuolele au funcţii diferite. Există vacuole digestive sau alimentare, cu substanţe de rezervă, excretoare, cu resturi din digestie etc. Amibele libere au în endoplasmă o vacuolă pulsatilă, cu caracter permanent şi care execută mişcări de contracţie şi destindere. Vacuola pulsatilă lipseşte la amibele parazite. (fig. 384).

Sub *forma chistică*, amibele parazite trec de la o gazdă la alta. Chisturile au unul sau mai mulți nuclei, o citoplasmă şi o membrană. Caracteristic pentru chisturi este modul de viață latentă. Izolarea relativă de mediul exterior se realizează prin învelişul membranos.

Condițiile în care se formează chisturile diferă pentru amibele libere şi cele parazite. Chisturile amibelor libere apar în împrejurări nefavorabile de existență a formelor vegetative. Chisturile amibelor parazite se formează în interiorul gazdei, în condiții prielnice existenței şi înmulțirii trofozoiților. Amibele parazite, dacă părăsesc organismul gazdei sub forma vegetativă, nu pot să reziste în mediul extern; ele degenerează şi mor şi nu pot să ia forma de viață latentă, nu se pot închista. Chistul de amibă, apărut în interiorul unei gazde, reprezintă forma infestantă pentru o nouă gazdă.

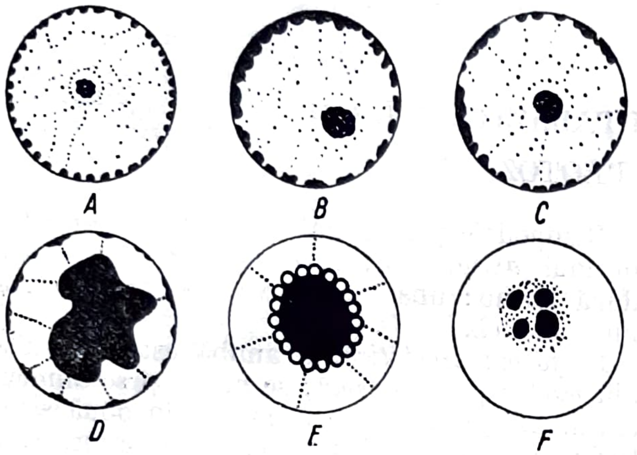


Fig. 385. — Reprezentare schematică a tipurilor de nuclei ai amibelor omului.

A — Entamoeba dysenteriae; B — Entamoeba coli; C — Entamoeba gingivalis; D — Endolimax nana; E — Pseudolimax (Jodamoeba) bütschlii; F — Dientamoeba fragilis (Belding, 1952, A, B şi F din Hegner, Robt, Augustine şi Huff, 1938).

Din punct de vedere practic, pentru diagnosticul bolilor parazitare de etiologie amibiană, identificarea chisturilor în produsele eliminate din organismul omului este de mare importanță, urmînd ca metode mai laborioase, să precizeze ulterior specia şi patogenitatea amibelor.

Clasificare. Amibele parazite fac parte din patru genuri: *Entamoeba*, *Endolimax*, *Pseudolimax* (sau *Iodamoeba*) şi *Dientamoeba*. Aceasta se diferențiază prin structura nucleului din forma vegetativă.

1. Genul *Entamoeba* are nucleul cu un cariozom central sau uşor excentric, iar periferic, pe partea internă a membranei nucleare, prezintă un şir de granulații de cromatină. Acestui gen îi aparține amiba patogenă pentru om *Entamoeba dysenteriae*, precum şi alte amibe considerate în general ca nepatogene: *Entamoeba coli*, *E. hartmanni*, *E. urogenitalis*, *E. gingivalis*, precum şi *E. dispar*, a cărei individualitate ca specie este discutată.

2. Genul *Endolimax* are nucleul cu un cariozom mare central. Din acest gen o singură specie, *Endolimax nana*, interesează parazitologia medicală.

3. Genul *Pseudolimax* (*Iodamoeba*) are nucleul cu un cariozom mare central, înconjurat de un şir de granulații acromatice. *Pseudolimax bütschlii* este singura specie parazită pentru om.

4. Genul *Dientamoeba* prezintă doi nuclei cu un cariozom mic, central, înconjurat de granule de cromatină. Fiecare granulă cromatică este legată radiar de membrana nucleară prin cîte un filament. Din acest gen face parte *Dientamoeba fragilis*, parazit al omului.

AMIBIAZA

Entamoeba dysenteriae

Amibiaza este o boală infecțioasă, datorită amibei patogene *E. dysenteriae*, cu localizare primitivă în colon şi uneori, secundar, în diferite organe, mai ales în ficat; tabloul clinic este caracteristic şi evoluția cronică, cu perioade acute de boală şi intervale de manifestări subclinice.

Morfologia parazitului. Amiba în formă de *trofozoit* este alungită, dimensiunile ei fiind 20—40μ/20—25 μ, uneori sub 20 μ. Protoplasma este vizibil împărțită în ectoplasmă şi endoplasmă. Ectoplasma este refringentă, are aspect sticlos, hialin, în contrast cu endoplasma, care are o structură granulară şi în care se pot observa hematii înglobate.

La amibele vii, nucleul este greu vizibil; el apare rotund şi situat de obicei excentric. În preparatele colorate cu hematoxilină ferică, nucleul prezintă un cariozom mic, central, o membrană nucleară fină, care are pe partea internă granulații cromatice mici şi egale în dimensiuni (fig. 386).

Pseudopodele sînt lungi, în general într-o singură parte a corpului. Amiba se deplasează aproape în linie dreaptă, ca şi cum s-ar îndrepta spre un anumit punct. Amiba se mişcă repede, mișcările ei urmărindu-se cu ușurință în preparatele microscopice proaspete.

E. dysenteriae se prezintă sub două forme, care răspund de stadiile clinice din cursul amibiazei intestinale: forma *minuta*, care ar fi incolină, se hrănește cu microorganisme și produce chisturi, și forma *magna*, corespunzătoare elementelor histolitice, patogene și care se hrănesc cu hematii.

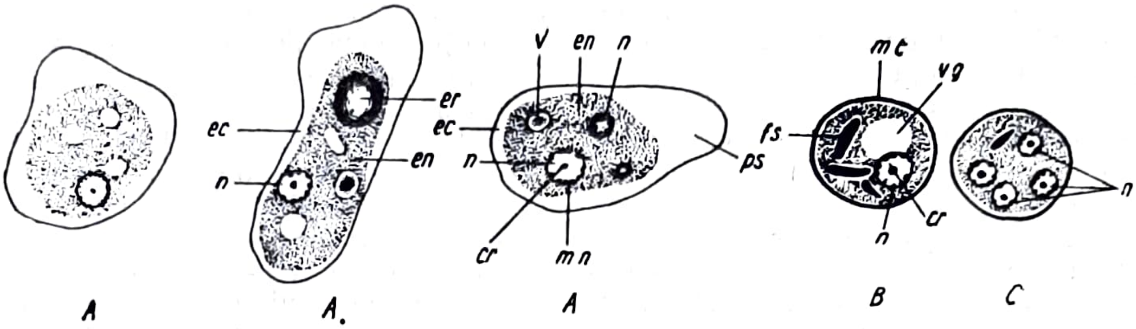


Fig. 386. — Entamoeba dysenteriae.

A – trofozoit; *B* – chist tînăr; *C* – chist matur; *ec* – ectoplasmă; *en* – endoplasmă; *n* – nucleu; *mn* – membrană nucleară; *cr* – cariozom; *v* – vacuolă; *ps* – pseudopod; *er* – eritrocit; *mc* – membrană chistică; *fs* – fibră siderofilă; *vg* – vacuolă cu glicogen.

Se pot observa de asemenea amibe mai rotunjite, mai imobile cu pseudopode scurte și groase. Acestea sînt *formele prechistice*, la care membrana chistică nu a apărut încă, iar nucleul este unic. În acest stadiu, amiba nu se mai hrănește.

Chistul este rotund, incolor, hialin, are dimensiuni variate între 5 și 20 μ. În privința dimensiunilor se consideră că chisturile mari și mici aparțin unor tulpini diferite. Chistul are o membrană chistică fină, cu un dublu contur. Chistul matur are 4 nuclei, cei tineri pot să prezinte 2—3 nuclei și baghete siderofile. În scaunul proaspăt predomină chisturile cu puțini nuclei.

Cînd un chist de amibă, eliminat în mediul extern, este ingerat de un individ și ajunge în intestinul terminal, se dechistează, dînd naștere unui trofozoit cu 4 nuclei, care se va divide ulterior corespunzător numărului nucleilor.

Ciclul evolutiv al parazitului. Chisturile eliminate cu fecale, în mediul extern, pot să ajungă pe mai multe căi în apa și alimentele înghițite de un individ receptiv. După dechistare, amibele se localizează în colon și în special în cec, colonul ascendent și sigmoid.

Amibele pot să trăiască incoline în organismul omului fără să provoace tulburări. În această fază, amibele dau naștere la chisturi care se elimină prin fecale în mediul extern, ciclul biologic continuînd astfel mai departe.

Producerea de chisturi este discontinuă, întreruptă de perioade negative, în care acestea nu apar în scaun.

În anumite condiții, amibele incoline devin patogene, histolitice, atacă pereții intestinali, determinînd fenomenul clinic de dizenterie. Bolnavii cu dizenterie activă elimină în scaunele diareice nu chisturi, ci formele vegetative ale amibei, forme care mor în mediul extern.

Rolul patogen al *E. dysenteriae*. Amibele atacă peretele intestinal, pătrund în submucoasă, unde se înmulțesc activ și au acțiune necrozantă. Se formează o pungă cu puroi în profunzimea peretelui intestinal, pungă care se mărește prin acțiunea continuă a amibelor la periferia abcesului. Abcesul comunică cu lumenul intestinal printr-un canal, dînd imaginea unui buton de cămașe. Ulterior comunicarea se lărgește și se formează ulcerații mari și profunde. Clinic boala se manifestă prin diaree muco-sanguinolentă, dureri la defecație, tenesme, febră. Concomitent se instalează o stare de intoxicație și deshidratare gravă. Pot să apară complicații ca infecții secundare cu floră microbiană, perforații intestinale, localizări metastatice amibiene în ficat, plămîn, creier etc.

Epidemiologia amibiazei. Principala sursă de infecție o constituie purtătorii sănătoși, asimptomatici și bolnavii cronici în fazele de acalmie clinică. Aceștia elimină prin scaun chisturi, care reprezintă singura formă infecțioasă a *E. dysenteriae*. În mediul extern, în condiții prielnice de umiditate și temperatură, chisturile trăiesc pînă la 10—12 zile în scaun și pînă la 30 de zile în apă, în funcție de flora bacteriană. Chisturile sînt sensibile la uscăciune, temperatură înaltă şi la dezinfectanţi. Este de remarcat faptul că, deşi chisturile pot să rămînă vii în mediul extern mai multe luni, ele nu sînt totuşi infecţioase decît scurtă vreme.

În transmiterea chisturilor, apa şi alimentele joacă un rol de frunte, putînd să determine adevărate epidemii de dizenterie amibiană. Condiţiile nefavorabile de igienă, mîinile murdare, transportul chisturilor pe picioarele muştelor şi prin tubul digestiv al acestora şi altele, reprezintă tot atîtea căi de trasmitere a bolii.

Diagnostic de laborator. Diagnosticul de certitudine al amibiazei constă în identificarea trofozoiţilor sau chisturilor în produsele eliminate din organismul omului. În mod obişnuit, paraziţii se găsesc în materiile fecale. Pot să fie întîlniţi de asemenea în peretele abceselor hepatice amibiene sau în puroi şi excepţional în lichidul duodenal, spută, lichid seminal, urină, lichid sinovial etc.

Recoltarea fecalelor nu prezintă dificultăţi. Pentru obţinerea unui bun rezultat trebuie respectate mai multe reguli. În fazele active ale dizenteriei se recoltează cu ansa, din scaunul diareic, un mic fragment preferîndu-se mucozităţile sanguinolente. În formele de amibiază asimptomatică, la purtătorii cronici, la suspecţi sau pentru controlul după tratament se ia un fragment din scaunul obişnuit, în scopul decelării chisturilor. Pentru identificarea trofozoiţilor se recoltează scaunul după administrarea unui purgativ salin (sulfat de sodiu) în doză laxativă (jumătate din doza purgativă). Examenul se face din primul scaun lichid, următoarele fiind prea diluate. Se poate recolta de asemenea scaunul după o clismă. Bolnavul este pus să defece cît mai curînd sau imediat înaintea examenului, într-un vas curat, cald şi uscat. Scaunul trebuie să nu fie amestecat cu urină. Urina distruge rapid protozoarele intestinale. La copii de vîrstă mică, recoltarea fecalelor se poate face cu sonda direct din intestin. Recoltarea de produse de examinat poate să fie efectuată de asemenea direct din intestinul terminal cu ocazia unui examen rectoscopic; se ia prin raclare sau tamponare material din ulceraţiile evidente. Metoda este însă dificilă, dureroasă şi riscantă din cauza sensibilităţii extreme şi a friabilităţii mucoasei. Transportul se va face cît mai repede spre locul de cercetare a materialului recoltat, păstrîndu-se condiţii de temperatură prielnice viabilităţii trofozoiţilor; se recomandă examinarea în primele 30 de minute de la emisiune sau în maximum 3 ore.

Examenul direct. 1. Din scaunul dizenteric, materialul mucosanguinolent prelevat se va examina direct între lamă şi lamelă, cu sau fără lichide diluante. Identificarea parazitului *E. dysenteriae* se face graţie mişcărilor vioaie ale amibelor observate, refringenţei ectoplasmei, vacuolizării endoplasmei şi mai ales prezenţei hematiilor în corpul amibei.

Examenul se va efectua la o temperatură pe cît posibil apropiată de 37°, folosind în acest scop lame şi lamele încălzite, platina microscopică încălzită, o sursă de căldură lîngă microscop sau utilizînd camera caldă conform modelului Foot. Aceasta este construită din pereţi de sticlă, cu o capacitate suficientă ca să cuprindă microscopul şi manipulările acestuia, în timp ce partea superioară a lunetei va rămîne în afara camerei calde. Dimensiunile camerei calde sînt aproximativ 50/35/30 cm, încălzirea interioară pornind de la o sursă oarecare (bec electric, bec de gaz). Mişcările rapide ale amibei se pot observa cu uşurinţă şi în condiţiile oferite de un laborator obişnuit, dacă se examinează materialul îndată de la eliminare. *Entamoeba dysenteriae* este cea mai activă dintre amibele care se pot întîlni în scaun. Apoi, treptat, se observă la microscop cum amiba nu se mai îndepărtează mult de pe locul ei, devine mai leneşă, dar emite totuşi pseudopode caracteristice. În cele din urmă încetează mişcările, amiba se rotunjeşte şi moare. Cînd mişcările au încetat, reîncălzirea preparatului nu le mai poate restabili. Paraziţii morţi se identifică foarte greu.

Erori de diagnostic pot să aibă loc în cazuri de dizenterie bacilară, cînd celule mari cu proprietăţi fagocitare şi vacuolizate pot să fie confundate cu amiba dizenteriei. Aceste celule pot să conţină eritrocite, dar se deosebesc de *E. dysenteriae* prin faptul că sînt lipsite de strălucirea hialină a ectoplasmei amibei, iar nucleii sînt mai mari şi mai net vizibili decît nucleul amibei. De asemenea, celule epiteliale pot să fie confundate cu amibele. La un examen microscopic al scaunului se pot observa de asemenea amibe neparazite cunoscute sub numele de *coprozoice*. Provenienţa lor în scaun este datorită uneori contaminării alimentelor cu chisturi care traversează tractul digestiv şi ajung în scaun. În general însă este vorba despre contaminarea directă a materialului examinat sau a apei folosită la diluţia fecalelor. Amibele coprozoice, fiind libere, au una sau mai multe vacuole contractile, iar chisturile lor au un perete gros. Diferenţierea *E. dysenteriae* de celelalte amibe parazite ale omului este posibilă pe baza caracterelor morfo-fiziologice ale acestora.

2. Pentru a obţine formele vegetative la un purtător care nu are o simptomatologie de dizenterie se examinează scaunul după purgativ, în condiţii asemănătoare celor de mai sus.

3. Decelarea chisturilor la un purtător cronic se face din scaunul obişnuit.

Se diluează fecalele pe lamă cu ser fiziologic sau soluţie Lugol. Chisturile fiind eliminate din intestin îndată ce sînt formate vor prezenta în scaunul proaspăt în special forme cu un singur nucleu. Pe măsură ce întîrziem examinarea, chisturile se maturează, devenind cvadrinucleate.

Soluţia Lugol clarifică structura chisturilor. Nucleii apar rotunzi, mici, la niveluri diferite, fapt decelabil prin mişcări ale vizei micrometrice. Lugolul colorează mai greu chisturile vechi.

Chisturile trebuie căutate atent la toţi suspecţii. Cu obiectivul slab (3) şi ocular puternic (10×), chisturile apar ca nişte globule grăsoase, rotunde. Pentru examinarea structurii chisturilor se utilizează obiectivul 7. De fapt, numai un examinator experimentat poate să identifice chisturile cu obiectivul 3. Pentru început, ele trebuie căutate numai cu obiectivul 7, examinînd atent un număr cît mai mare de cîmpuri microscopice.

Un fenomen deosebit de important este acela al *perioadelor negative*, de durată variabilă, în mijlociu 8—10 zile, în care chisturile nu apar în scaun. Acest fapt impune repetarea examenului coprologic de cel puţin 2—3 ori, la intervale de cîteva zile, pentru ca să se poată infirma starea de purtător de amibe a unui om.

Examenul prin colorare cu eozină 2% în soluţie apoasă ne dă date asupra viabilităţii paraziţilor. Amibele şi chisturile vii nu se colorează.

Coloraţii vitale pot să fie obţinute cu o soluţie 1/10 000 roşu neutru în ser fiziologic. Se amestecă pe lamă o picătură din colorant cu fecale. Se examinează preparatul sub lamelă, cu obiectiv puternic. *E. dysenteriae* apare cu endoplasma colorată în roz, ectoplasma rămînînd necolorată. Amibele banale apar incolore sau cenuşii.

Examenul coprologic de îmbogăţire pentru chisturile de amibe se efectuează conform metodei Telemann. Metoda fiind laborioasă, iar perioadele negative frecvente, metoda de examinare prin concentrare este indicată numai pentru cazuri speciale, cum ar fi controlul după tratament sau suspiciunea unui purtător cronic.

Pentru a obţine *preparate colorate durabile* se execută frotiuri pe lamă din mucozităţile din fecale. Se fixează frotiurile umede, cu faţa în jos, în Bouin. Colorarea frotiurilor cu hematoxilină ferică sau prin metoda Romanovski evidenţiază detalii de structură, în special privind nucleul.

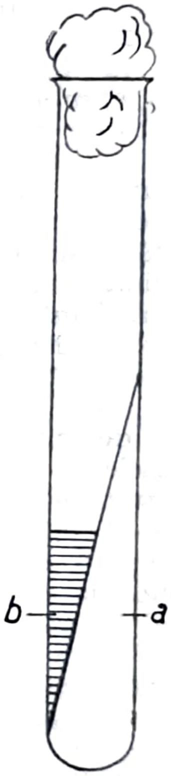


Fig. 387. — Tub cu mediul Löffler pentru coprocultură.

a — mediul Löffler înclinat; *b* — coloană de lichid format din soluţie salină şi lichidul de condensare al mediului (Lupaşcu, Spînu, Sorescu, Panaitescu, Hacig şi Solomon, 1959).

Culturile de E. dysenteriae constituie un preţios mijloc de identificare a parazitului.

Cercetările şcolii romîne de parazitologie, în această direcţie au dus la concluzia existenţei amibiazei intestinale în ţara noastră într-o proporţie destul de ridicată. Lupaşcu, Spînu şi colaboratorii (1959), prin metoda coproculturilor în masă, pe grupe de adulţi şi copii, au găsit *E. dysenteriae* forme tipice în 4,7% cazuri studiate. Nenumărate medii de cultură au fost utilizate pentru protozoare intestinale în general şi pentru *E. dysenteriae* în special. Autorii romîni menţionaţi consideră drept superioară metoda Simici, care foloseşte mediul Löffler, faţă de alte medii de cultură (Dorset, Drbohlav).

În principiu, orice mediu de cultură a amibelor trebuie să aibă trei elemente: un suport solidificat în strat înclinat, constituit din ou coagulat, geloză sau ser coagulat; un lichid salin sau cu albumină care acoperă mai mult sau mai puţin stratul înclinat solid; un element figurat, necesar pentru hrana amibelor şi care este amidonul de orez (exclusiv de orez) sau pulbere de carne. Reacţia mediului variază de la pH 7,2 — 7,6 la începutul culturii, către pH acid 6,6 favorabil dezvoltării amibelor, rezultat din fermentaţia amidonului. Ulterior are loc un proces de putrefacţie a mediului, cu alcalinizarea consecutivă şi dispariţia amibelor.

pH inițial peste 8 este nefavorabil cultivării parazitului.

Metoda Simici și Petrovici constă în folosirea mediului Löffler înclinat, nemodificat (fig. 387). Se însămînțează din scaunul proaspăt diluat în ser fiziologic o cantitate de 5 — 8 picături în lichidul de condensare al mediului. După însămînțare se adaugă o ansă de amidon de orez. Se introduce o cantitate de ser fiziologic cald (37°), astfel încît nivelul final al lichidului să ajungă la jumătatea înălțimii mediului înclinat. Se controlează pH mediului, cu o hîrtie indicator. Eprubetele se incubează la 37°. Controlul culturilor se efectuează după 24, 48, 72 de ore. La fiecare examinare, lichidul din eprubetă este decantat. Se recoltează cu ajutorul unei pipete Pasteur cîteva picături din sedimentul dens din fundul eprubetei. Se caută să se preleveze chiar de pe suprafața mediului solid, apăsînd ușor și raclînd mediul, fără să se introducă însă vîrful pipetei în partea solidă a mediului. Se examinează la microscop între lamă și lamelă. Lama trebuie să fie încălzită. Examenul se face cu ocular 10 × și obiectiv 7. După fiecare control se adaugă în eprubetă o cantitate de soluție salină egală cu cea decantată, precum și amidon de orez. Eprubetele se reintroduc la termostat la 37°. Cînd rezultatul este negativ, se repetă cultura de 3 — 4 ori la intervale diferite. Amidonul de orez se sterilizează în eprubete, în cantități mici, la căldură uscată pînă la 90°, în 3 etape de 4 ore.

Pentru *xenodiagnosticul* amibiazei intestinale se utilizează șobolanul și pisica. Cîinele, maimuța cobaiul, iepurele de casă ș.a. sînt de asemenea sensibile la *E. dysenteriae.* La șobolanii albi, inocularea se face intracecal. După laparatomie sub narcoză se introduc în cec 1 — 2 ml din scaunul diluat. Trebuie să se aibă în vedere ca animalele să nu aibă amibiază proprie cu *E. muris* în acest scop se fac controale prealabile prin examene coprologice obișnuite sau prin culturi.

După 5 zile se sacrifică șobolanul și se cercetează macroscopic aspectul cecului pentru decelarea apariției unor eventuale zone hemoragice ale mucoasei, aspect caracteristic infecției cu *E. dysenteriae.*

Se cercetează de asemenea prezența paraziților prin frotiuri, raclîndu-se mucoasa cecală, sau prin însămînțări pe mediul Löffler.

Inocularea la pisică a fost recomandată de Brumpt pentru diagnosticul diferențial dintre *E. dysenteriae* patogenă și *E. dispar* care nu ar fi patogenă pentru om. Se inoculează intrarectal la un pisoi, cu sonda, 20 ml fecale de la un bolnav suspect de amibiază. Se colodionează anusul animalului, iar după 24 de ore se examinează la microscop fecalele lui. Numai *E. dysenteriae* ar prezenta eritrocite încorporate și ar provoca leziuni caracteristice în intestinul animalului.

Reacția de fixare a complementului cu extras alcoolic din cultură sau *intradermoreacția* cu extras glicerinat nu au intrat în practica diagnosticului amibiazei.

Reactiile de disproteinemie pot să fie pozitive, proporțional cu gradul de afectare a ficatului.

Diagnosticul amibiazei cu alte localizări este o problemă dificilă. Forme vegetative ale *E. dysenteriae* pot să fie întîlnite în expectorație sau în puroiul provenit din diferite colecții.

În aceste localizări nu se produc chisturi, iar examenul direct este insuficient pentru identificarea speciei de amibă. În aceste cazuri se recurge la examinarea unor frotiuri colorate cu hematoxilină ferică, la culturi sau inoculări la animale sensibile.

ALTE AMIBE PARAZITE ALE OMULUI

Entamoeba coli

Morfologie. *Entamoeba coli* are *formele vegetative* de 20—30 μ, în general sub 25 μ. Seamănă cu *E. dysenteriae,* dar diferența dintre ectoplasmă și endoplasmă este mai puțin vizibilă. În protoplasmă se observă vacuole alimentare cu diferite particule și bacterii. Parazitul nu înglobează hematii (fig. 388).

Pseudopodele sînt mai mici. Pe un preparat proaspăt, amiba apare mai puțin mobilă decît *E. dysenteriae.* Totuși într-un scaun recoltat după purgație, examinat la 30—35°, *E. coli* se mișcă destul de vioi, vioiciune pe care o pierde însă mult mai repede decît *E. dysenteriae,* pe măsură ce temperatura scade.

Nucleul este mai net vizibil, în preparate proaspete, decît nucleul *E. dysenteriae.* El este situat către centrul celulei, are cariozomul excentric, iar granulațiile cromatice de pe partea internă a membranei nucleare sînt mai mari și inegale.

Chisturile sînt rotunde sau ușor ovalare, au 15—25 μ, uneori ajungînd la 30 μ, sînt incolore și foarte refringente. Peretele chistului se distinge bine și are de obicei un dublu contur.

Chisturile mature au 8 nuclei rotunzi, cele imature au mai puțini nuclei. Chisturile imature prezintă o vacuolă cu glicogen care dispare treptat.

Ciclul evolutiv. Amiba se înmulțește prin sciziparitate. Chisturile se elimină din organismul omului o dată cu scaunul.

Purtate pe o cale oarecare prin mediul extern, chisturile pot să ajungă o dată cu alimentele sau cu apa de băut în tubul digestiv al unui individ. După dechistare, trofozoiții se localizează în intestinul gros, unde se înmulțesc.

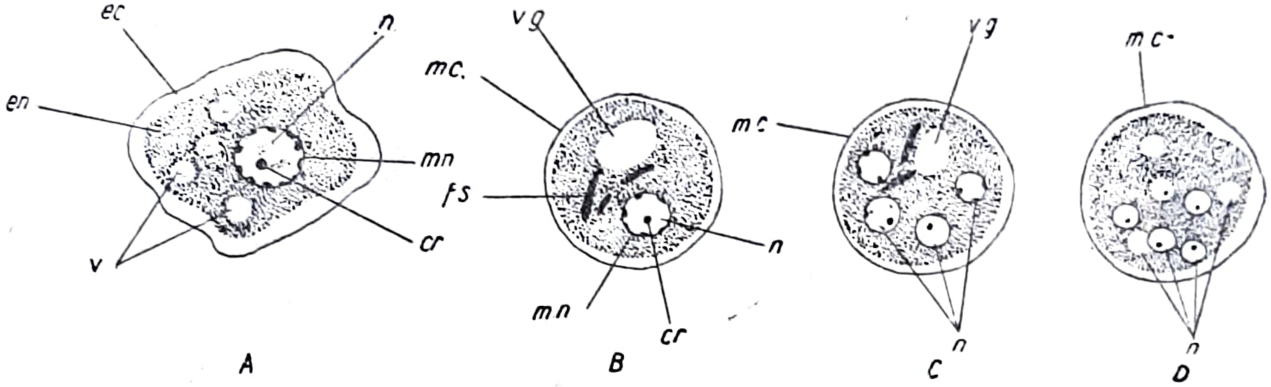


Fig. 388. — Entamoeba coli.
A — trofozoit; B și C — chist tînăr; D — chist matur; *ec* — ectoplasmă; *en* — endoplasmă; *n* — nucleu; *mn* — membrană nucleară; *cr* — cariozom; *v* — vacuolă; *mc* — membrană chistică; *vg* — vacuolă cu glicogen; *fs* — fibră siderofilă (din mai mulți autori).

Rol patogen. *Entamoeba coli* este un parazit incolin al omului, neavînd un rol patogen determinat. Parazitul nu este hematofag, hrana lui fiind constituită din elementele microflorei și faunei intestinale.

În cazuri excepționale, *E. coli*, contribuie la întreținerea unei colite preexistente sau poate să complice unele leziuni anterioare ale colonului.

Diagnostic de laborator. Este identic cu al *E. dysenteriae*. Examenul coprologic microscopic se efectuează direct, prin colorare cu soluție Lugol și prin metoda de concentrare.

Faptul că chisturile de *E. coli* sînt în general mai mari decît cele de *E. dysenteriae* nu constituie un element cert de diferențiere a celor două amibe. Natura chistului se stabilește numai în funcție de numărul de nuclei. Dar și în această privință se ivește neajunsul că *E. coli* poate să prezinte chisturi imature, cu un număr de nuclei mai mic de 8. De asemenea trebuie să se aibă în vedere faptul că nucleii se identifică cu oarecare dificultate. Examenul trebuie să se efectueze cu obiectivul 7. Fiind situați la nivele diferite, nucleii trebuie cercetați cu atenție manevrînd viza micrometrică a microscopului.

Examinarea microscopică a trofozoiților într-un scaun diareic sau după purgație precum și culturile pe medii artificiale se execută potrivit acelorași tehnici ca și pentru *E. dysenteriae*. *E. coli* inoculată la animalele sensibile față de *E. dysenteriae*, nu provoacă leziuni.

Entamoeba dispar

Este o specie de amibă a cărei existență este discutată. A fost descrisă ca semănînd perfect cu exemplarele mici nepatogene ale *E. dysenteriae*. Chisturile sînt de asemenea identice cu cele de *E. dysenteriae* ca număr de nuclei și ca dimensiuni. S-a considerat că rolul ei patogen pentru om este nul. Drept criteriu de diagnostic diferențial între aceste două amibe, care morfologic seamănă atît de bine între ele, s-a indicat inocularea la pisica tînără. La acest animal, *E. dispar*, spre deosebire de *E. dysenteriae* nu ar da decît mici leziuni de necroză.

E. dispar ar explica numărul mic de cazuri de dizenterie amibiană din zona temperată, față de procentul mai ridicat al purtătorilor de chisturi cu 4 nuclei. Majoritatea parazitologilor înclină spre ideia că *E. dispar* nu reprezintă decît o formă mai puțin patogenă pentru om sau stadiul nepatogen al *E. dysenteriae*.

Entamoeba hartmanni

Este o amibă mică de 6—10 μ. Ectoplasma se diferențiază greu de endoplasmă. Chisturile au 6—8 μ, conţin baghete siderofile şi 4 nuclei. Amiba nu este patogenă. Ea trăieşte incolin în intestinul gros.

Entamoeba gingivalis

Este o amibă de dimensiuni mari, 10—30 μ. Ectoplasma este net diferenţiată de endoplasmă. Emite pseudopode puternice şi se mişcă destul de repede. Nucleul cu cariozomul excentric, este vizibil în preparatele proaspete. Chisturile nu se cunosc. Rolul patogen al acestei amibe este discutat (Pavlovski, 1959). Amiba se localizează în cariile dentare, criptele amigdaliene şi la baza dinţilor. A fost identificată şi în expectoraţie, provenind din caverne pulmonare. În pioreele alveolare, rolul ei etiologic nu este încă bine precizat.

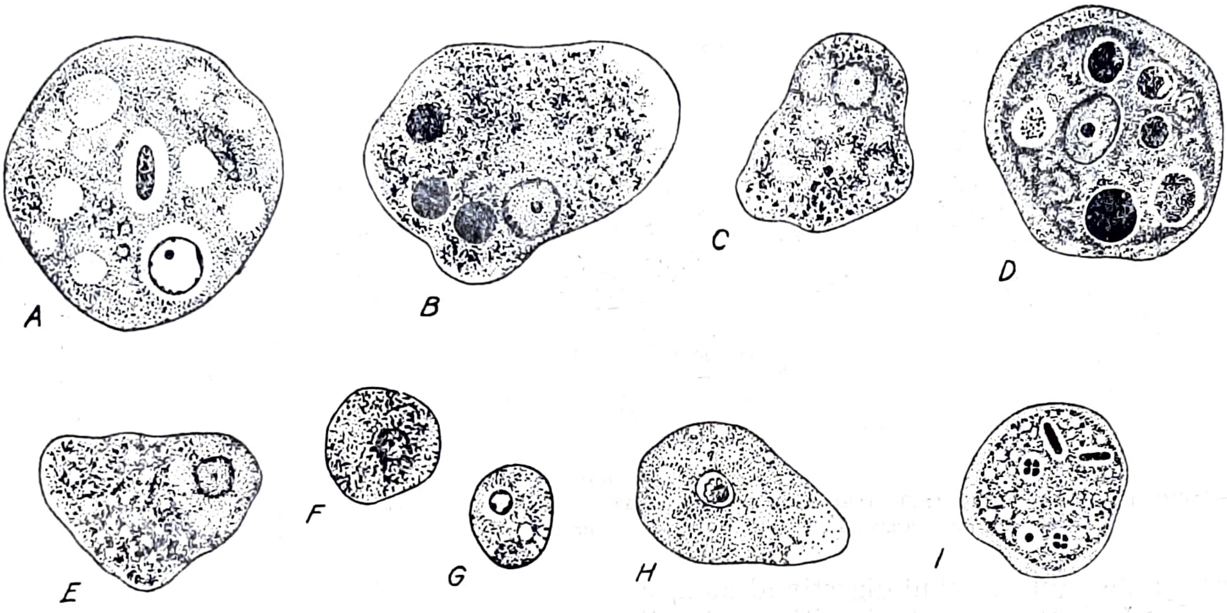


Fig. 389. — Amibe parazite ale omului. Trofozoiţii (× 2 000).
***A** — Entamoeba coli*; ***B** şi **C** — Entamoeba dysenteriae forma magna* (*B*) *şi minuta* (*C*); ***D** — Entamoeba gingivalis*; ***E** — Entamoeba dispar*; ***F** — Entamoeba hartmanni*; ***G** — Endolimax nana*; ***H** — Pseudolimax bütschlii*
(A, B, C, E, F, G, H din Brumpt şi Neveu-Lemaire, 1951, şi D, I din Belding, 1952).

Endolimax nana

Este o amibă mică de 6—10 μ, ovalară, emiţînd pseudopode într-o singură direcţie. Citoplasma este vacuolizată. Ectoplasma nu se individualizează faţă de endoplasmă. Chisturile sînt mici, de 8—10μ, ovalare, cu 4 nuclei grupaţi spre unul din polii chistului. Cariozomul este mare, excentric. Parazitul se localizează în intestinul gros al omului. Este o amibă incolină.

Pseudolimax bütschlii (*Iodamoeba*)

Este o amibă mică de 8—10 μ. Mişcările ei sînt încete. Ectoplasma nu este individualizată. Nucleul este caracteristic genului. Chisturile au 8—10 μ, sînt ovalare sau turtite într-o parte. Au un singur nucleu mic. În protoplasmă se observă o vacuolă cu glicogen. Această vacuolă iodofilă se colorează în brun cu soluţia Lugol.

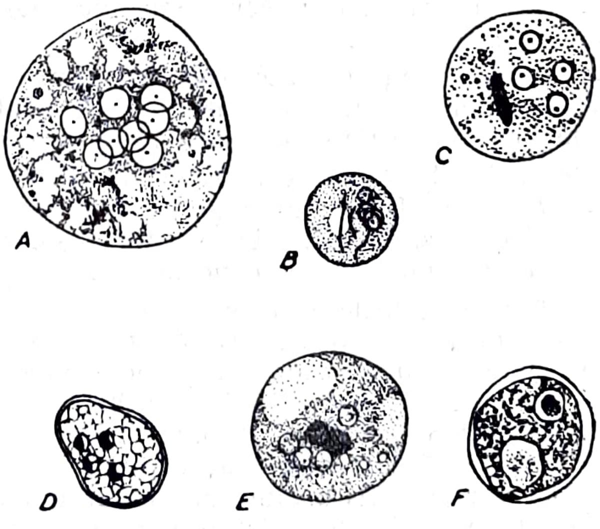


Fig. 390. — Amibe parazite ale omului. Chisturi (× 2 000)
***A** — Entamoeba coli*; ***B** — Entamoeba hartmanni*; ***C** — Entamoeba dysenteriae*; ***D** — Endolimax nana*; ***E** — Entamoeba dispar*; ***F** — Pseudolimax bütschlii* **(din Brumpt şi Neveu-Lemaire, 1951).**

Parazitul se găsește doar ocazional la om, fiind un parazit al porcului. Se localizează în intestinul gros, iar rolul lui patogen este nul.

Dientamoeba fragilis

Este o amibă mică, de 8—12 μ, mobilă, cu ectoplasma net diferențiată de endoplasmă. Nucleul este dublu. Caracteristică este sensibilitatea deosebit de marcată a amibei în mediul extern, unde amiba ia forma rotundă, se vacuolizează și nucleii se dispun marginal și opus unul altuia. Această formă de degenerare poate să se confunde cu o ciupercă frecvent întîlnită în materiile fecale, *Blastocystis hominis*. Chisturile, descrise de Epstein, în U.R.S.S. sînt ovalare, au 14 μ. Citoplasma nu prezintă incluzii. Chistul are 4 nuclei situați în linie dreaptă la unul din poli. Amiba se localizează în intestinul gros, nefiind patogenă.

CLASA FLAGELATE

Flagelatele sînt protozoare care se deplasează cu ajutorul unor flageli, se reproduc asexuat, corpul lor este orientat cu un pol anterior și unul posterior și au doi nuclei, unul cu funcții vegetative și unul cu funcții de mișcare și reproducere.

Morfologie. Corpul unui flagelat este în general alungit. Prezintă la exterior un înveliș, numit periplast.

Citoplasma nu este împărțită în ecto și endoplasmă, ci se înfățișează ca o masă unică, cu o structură fină. În protoplasmă se găsesc uneori particule alimentare. Vacuola contractilă lipsește la flagelatele parazite.

Parazitul are un ***nucleu*** situat central sau către una din extremitățile corpului. Nucleul are un cariozom mare în poziție centrală.

Pe lîngă nucleu flagelatele mai prezintă un ***chinetoplast*** (cunoscut și sub denumirea discutată de ***chinetonucleus***). Acesta este alcătuit din ***blefaroplast*** și ***corpusculul parabazal***, care este mai intens colorat.

Flagelul, organ de mișcare, se inserează pe blefaroplast. Porțiunea internă a flagelului se numește rizostil; porțiunea externă, liberă, este alcătuită dintr-un ax cromatic, *axonem* și o teacă protoplasmatică contractilă.

Unele flagelate au o piesă de susținere acromatică, ***axostilul***.

Flagelatele se hrănesc prin osmoză sau printr-un ***citostom***. Hrana poate să fie uneori înglobată cu ajutorul pseudopodelor. Se înmulțesc prin diviziune binară.

Clasificare. Flagelatele se împart în două ordine: *Protomonadide*, cu un singur nucleu vegetativ și flageli puțini (1 — 6) și ***Diplomonadide***, cu doi nuclei vegetativi, simetrie bilaterală și mai mulți flageli. Din punct de vedere practic împărțim flagelatele parazite ale omului în două grupe: o grupă de paraziți ai sîngelui și țesuturilor, care se transmit prin vectori hematofagi, și o grupă de paraziți care trăiesc în tubul digestiv sau în cavitățile genitale, care se transmit fără vectori.

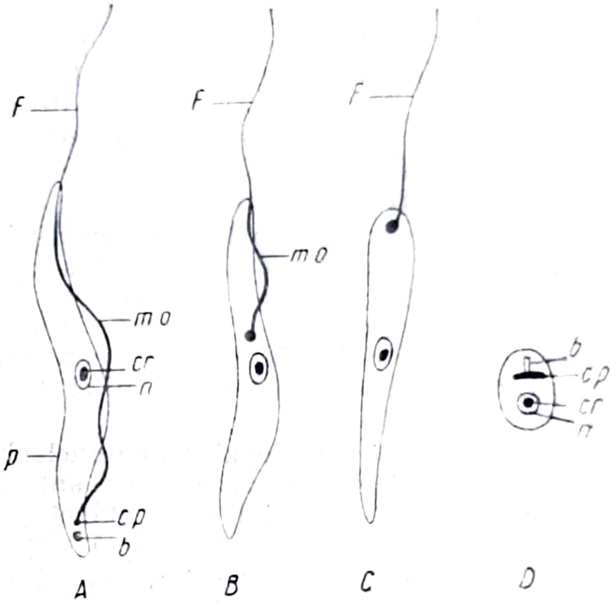


Fig. 391. — Forme ale paraziților din familia *Trypanosomidae*.

A **– forma de tripanosoma**; *B* – forma de critidia; *C* – forma de leptomonadă; ***D*** **– forma de leishmanie**; *p* – periplast; *n* – nucleu; *cr* – cariozom; *b* – blefaroplast; *f* – flagel; *mo* – membrană ondulantă; *cp* – corpuscul parabazal.

Bolile determinate de prima grupă de paraziți sînt în general grave, iar diagnosticul este dificil. Paraziții fac parte din familia ***Trypanosomidae***. Importante pentru parazitologia umană sînt speciile ***Trypanosoma gambiense***, ***T. rodesiense***, ***T. cruzi***, ***Leishmania tropica***, ***L. donovani***, ***L. brasiliensis***.

Paraziții din familia ***Trypanosomidae*** se caracterizează prin prezența unui singur nucleu vegetativ și a unui singur flagel rudimentar sau liber, cu membrană ondulantă. De o deosebită importanță este faptul că speciile din această familie, în diferite etape ale ciclului lor biologic, pot să-și schimbe aspectul morfologic, luînd forma de tripanosoma, critidia, leptomonas şi leishmania (fig. 391).

În forma *tripanosoma*, parazitul este alungit şi ascuţit la extremităţi. Periplastul este subţire, nucleul central, cu un cariosom mare. Flagelul porneşte din chinetoplastul situat posterior şi formează o membrană ondulantă în tot lungul parazitului. Flagelul devine liber la capătul anterior al corpului.

În forma *critidia*, parazitul are aceeaşi formă, nucleul fiind tot central. Chinetoplastul este însă situat alături de nucleu. Flagelul, pornind din chinetoplast, formează deci în drumul lui către extremitatea anterioară a parazitului o membrană ondulantă, mult mai scurtă decît în forma tripanosoma.

Forma *leptomonas* este aciculară, cu nucleul central. Chinetoplastul la extremitatea anterioară a corpului, nu mai permite flagelului să formeze o membrană ondulantă. Flagelul se liberează direct din chinetoplast, perforează extremitatea anterioară a parazitului şi devine liber.

Forma *leishmania* este ovalară, cu nucleul situat posterior. Chinetoplastul se găseşte anterior. Din flagel rămîne rizostilul între chinetoplast şi periplast, în timp ce partea liberă dispare.

Din a doua grupă de flagelate parazite în cavităţi fac parte: *Lamblia intestinalis* (familia *Octomitideae*), *Trichomonas vaginalis*, *T. intestinalis* şi *T. bucalis* (familia *Trichomonadidae*), *Chilomastix mesnili* (familia *Chilomastigidae*) şi altele. Caracteristic pentru flagelatele parazite în cavităţi este faptul că ele cultivă cu excepţia lambliei, pe medii de laborator, mult mai uşor decît flagelatele sanguicole şi tisulare.

BUTONUL DE ORIENT SAU BOALA BOROVSKI

Leishmania tropica

Butonul de orient este o afecţiune nodulară şi ulcerativă, localizată, cronică şi benignă. După vindecare, ulceraţia lasă o cicatrice profundă. Agentul cauzal al bolii este *Leishmania tropica*, iar vectorul, un flebotom.

Morfologia parazitului. La om, parazitul are forma de leishmania, este ovalar, măsurînd 2 — 4 μ/1 — 2μ. În preparatele colorate, citoplasma apare albastru-palid, nucleul mare, rotund, colorat puternic în roşu, situat posterior. Către polul anterior se observă blefaroplastul, colorat în roşu şi rizostilul.

În flebotom şi în culturi, parazitul ia forma de leptomonas.

Ciclul biologic. Gazda vertebrată a parazitului este reprezentată de om şi unele specii de rozătoare. La om, leptomonadele inoculate de flebotom nu invadează întreg organismul, ci rămîn cantonate la poarta de intrare, retrăgîndu-se intracelular. Parazitul se înmulţeşte activ sub forma de leishmanie. Dacă un flebotom din speciile *Phlebotomus papatasii* sau *P. sergenti*, *P. caucasicus*, *P. chinensis*, *P. arkaplensis* (Demina, Latîşev şi Kriukova) va înţepa un om în vecinătatea localizării parazitului în piele, leishmaniile ingerate o dată cu sîngele se vor transforma în leptomonade şi se vor înmulţi. Cu ocazia unui nou prînz sanguin, flebotomul va inocula leptomonadele la om, evoluţia parazitului urmînd acelaşi ciclu.

Rol patogen. *Leishmania tropica* determină la om afecţiunea cunoscută sub numele de leishmanioză cutanată (sens strict), buton de orient sau boala Borovski. Leziunea are iniţial aspectul unei micropapule, care evoluînd lent duce la apariţia unei leziuni supurate, acoperite de o crustă, leziune care se vindecă spontan după o lungă perioadă, lăsînd o cicatrice persistentă. Kojevnikov, Latîşev, Krinkova şi alţi cercetători din şcoala sovietică, studiind formele clinice ale bolii, au diferenţiat forma uscată, urbană sau leishmanioza cutanată *tarde exulcerans*, cu evoluţie lentă şi paraziţi mulţi în leziuni, şi forma umedă, rurală, sau leishmanioza cutanată *cito exulcerans*, cu evoluţie mai rapidă şi leishmanii mai rare în leziuni.

Boala lasă o imunitate de durată.

Epidemiologie. Boala este răspîndită în Africa de nord, Asia centrală, India şi în jurul mării Mediterane. Rezervor de infecţie sînt omul şi animalul bolnav. Autorii sovietici au studiat focalitatea naturală a bolii Borovski. Latîşev a găsit ulcere leishmaniene la rozătoarele sălbatice *Rhombomys opimus* şi *Spermophilopsis leptodactilus*, animale care constituie rezervorul de paraziţi în natură. Vectorul bolii este flebotomul. Cercetări epidemiologice şi parazitologice au dovedit că *Phlebotomus papatasii* nu este unica specie vector. Autorii sovietici au stabilit că boala Borovski forma uscată este transmisă de *P. papatasii*, *P. sergenti*, *P. caucasicus* şi *P. chinensis*, în timp ce forma umedă a bolii este transmisă de *P. papatasii*, *P. caucasicus* şi *P. arkaplensis*.

Diagnostic de laborator. Punerea în evidență a parazitului în leziune precizează diagnosticul bolii. *Recoltarea materialului* pentru examenul microscopic este diferită în primele faze ale bolii, cînd leziunea nu a ajuns la ulcerație, față de fazele mai înaintate. În cazul butonului neulcerat se puncționează după o prealabilă dezinfectare a regiunii și se extrage o serozitate tulbure sau ușor sanguinolentă din centrul papulei sau al nodulului. Se întind frotiuri sau se însămînțează pe medii speciale. Recoltarea se poate face și prin secționarea butonului neulcerat, raclînd suprafața de secțiune.

După ulcerare, paraziții trebuie căutați în pereții leziunii, nu în puroiul central. Se puncționează marginile indurate sau se excizează un lambou marginal sau o granulație cărnoasă care tapetează ulcerul. Se poate racla peretele ulcerului, avînd grijă să nu se ajungă la sîngerare; paraziții nu se întîlnesc în sînge ci numai în elementele țesutului inflamat.

Examinarea se face în frotiuri sau în secțiuni din materialul recoltat prin biopsie.

Paraziții apar în grupuri în protoplasma celulelor endoteliale, în monocite sau în celulele epitelioide. Celulele sînt inegal invadate de paraziți în funcție de gradul de înmulțire a acestora. Unii paraziți se văd liberi prin spargerea celulei gazdă.

Leishmaniile sînt foarte numeroase în leziunile recente din faza de invazie a bolii, cînd butonul este neulcerat și din faza de stare. În leziunile vechi, paraziții sînt din ce în ce mai rari. În sînge parazitul este absent.

Reacția de fixare a complementului și *reacțiile de aglutinare* pe lamă sau în eprubetă au fost încercate. Valoarea lor este încă discutată.

LEISHMANIOZA VISCERALĂ

Leishmania donovani

Leishmanioza viscerală este o boală febrilă gravă, subacută, datorită parazitului *L. donovani* și transmisă de flebotomi. Boala are mai multe arii de răspîndire în zonele tropicale și subtropicale, prezentînd în fiecare arie un anumit aspect clinic și epidemiologic. Se diferențiază astfel kala-azarul sau leishmanioza viscerală din India și Sudanul african, leishmanioza viscerală infantilă din bazinul mediteranean, leishmanioza viscerală din America de Sud, precum și unele forme din Asia centrală.

Morfologie. Parazitul este întru totul asemănător cu *L. tropica*.

Ciclul biologic este și el asemănător. În vector, parazitul ia forma de leptomonas, iar la om forma de leishmanie. Deosebirea constă în aceea că parazitul nu rămîne cantonat la poarta de intrare în organism, la locul de inoculare, ci se răspîndește în corp. Parazitul se localizează mai ales în viscere (fig. 392), dar este prezent, atît în sîngele circulant, cît și în piele.

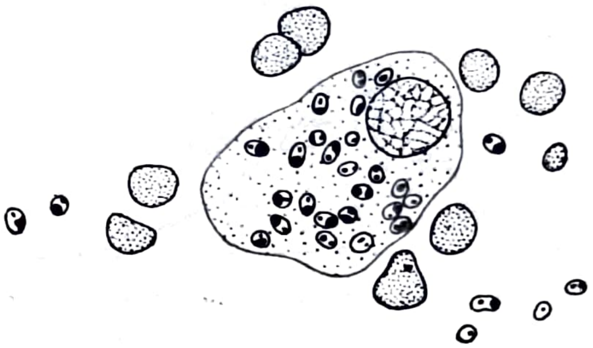


Fig. 392. — Leishmania donovani. Splină de hamster (amprentă). Paraziții intra- și extracelulari.

Rol patogen. *Leishmania donovani* este agentul etiologic al unei boli foarte grave a omului, boală cunoscută sub numele de leishmanioză viscerală sau kala-azar. Clinic boala se manifestă prin febră și splenomegalie, iar hematologic printr-o anemie și leucopenie excesiv de pronunțată. Boala evoluează îndelung cu nenumărate complicații și manifestări secundare, tratamentul este dificil, iar prognosticul rezervat.

Epidemiologie. Leishmanioza viscerală este o boală răspîndită în Africa de nord, bazinul mediteranean, Asia centrală, India, China, America de Sud. În diferite zone ale ariei de răspîndire, boala prezintă caracteristici clinice și epidemiologice nete. Uneori aceste deosebiri sînt suficient de marcate pentru a îndreptăți pe unii cercetători să considere că este vorba despre entități nosologice și etiologice diferite. Astfel se disting pe glob cinci zone mari de răspîndire, în care boala prezintă anumite particularități clinico-epidemiologice: în India boala apare la adulți, rezervorul de germeni este omul, iar vectorul, *Phlebotomus argentipes*; în jurul bazinului mării Mediterane boala se observă mai ales la copii; rezervorul de germeni este incriminat cîinele, iar ca vector *P. perniciosus* şi *P. major*; în China există regiuni în care boala apare mai mult la copii, iar în altele afectează în special adulţii; în Sudan, boala prezintă asemănări cu cea din India; America de Sud constituie a cincea zonă în aria de răspîndire a leishmaniozei. De un interes deosebit este focarul de leishmanioză viscerală din Asia centrală, studiat în amănunţime de cercetătorii sovietici. Maruaşvili (1955), cercetînd clinica leishmaniozei şi biologia parazitului, susţine teoria existenţei mai multor varietăţi ale speciei, ca *L. donovani var. mediterranea*, *L. donovani var. chagasi* şi altele, pentru ca să explice particularităţile diferitelor focare de pe glob.

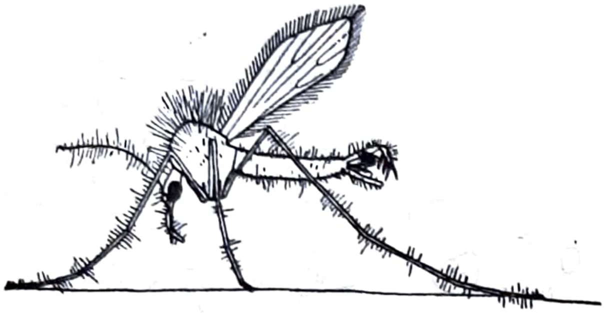


Fig. 393. — Phelebotomus (Larroussius) perfiliewi mascul.

În ţara noastră, focarul de leishmanioză apărut în regiunea Craiova a avut caracterul leishmaniozei mediteraniene. Bolnavii de vîrstă mică au prezentat mai ales forme grave. Cercetările efectuate în focar şi în natură de Lupaşcu şi colaboratorii (1955) au dus la concluzia că vectorul bolii este *Phelbotomus perfiliewi* (fig. 393 şi 394), specie identificată atunci pentru prima dată în ţara noastră. Acelaşi autor găseşte cîini infectaţi cu leishmanii tot în focarul din regiunea Craiova. Cercetările ulterioare ale lui Lupaşcu şi colaboratorii au stabilit că de fapt aria de răspîndire a speciilor de flebotomi, cunoscuţi drept vectori ai leishmaniozei viscerale, este mult mai vastă în ţara noastră, întinzîndu-se în valea Dunării.

Diagnosticul de laborator al leishmaniozei viscerale este dificil. Dificultăţile sporesc mai cu seamă în zonele situate la limita ariei de răspîndire a bolii, cum este cazul ţării noastre, deoarece raritatea cazurilor sustrage atenţia medicilor de la această boală tropicală. Diagnosticul este îngreunat de faptul că produsul de examinat în laborator se recoltează din organele profunde, iar bolnavii au o slabă rezistenţă fiziologică şi deci sînt extrem de sensibili la astfel de tehnici de recoltare. Pentru diagnosticul kala-azarului s-au imaginat nenumărate metode. Dintre acestea, unele sînt de certitudine, punînd în evidenţă parazitul, iar altele sînt numai prezumtive.

Diagnosticul de certitudine se bazează pe identificarea leishmaniilor în sînge, splină, ficat, ganglioni limfatici, măduva oaselor, piele şi mucoase, precum şi pe reacţii imunologice. Pentru identificarea agentului patogen din materialul recoltat se fac frotiuri, care se colorează prin metoda Romanovsky, însămînţări pe mediul NNN şi inoculări la animale receptive.

În *sîngele periferic*, paraziţii sînt rari şi greu de găsit, în special în formele mediteraniene de boală. La examenul microscopic, paraziţii apar în monocite şi mai puţin în celulele polimorfonucleare neutrofile. Paraziţii pot să fie căutaţi în frotiuri, în picătură groasă sau după efectuarea unor metode de concentrare prin centrifugare sau sedimentare. În frotiuri, paraziţii trebuie căutaţi cu foarte multă răbdare pe cel puţin 9 — 10 preparate. Rezultatul pozitiv nu depăşeşte 10% din cazurile de boală.

Culturile pe mediul NNN cu punct de plecare în sînge sînt mult mai valoroase, în special dacă se efectuează repetat. Rezultatul poate să atingă 90 — 100%, paraziţii apărînd în 11 — 12 zile. Se însămînţează sîngele, fie direct, fie citratat şi centrifugat.

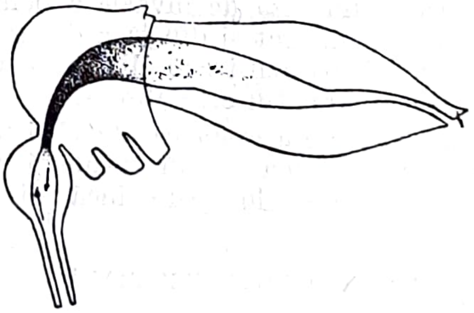


Fig. 394. — Mecanismul de inoculare a leishmaniilor prin flebotom. Formele *leptomonas* dezvoltate în tubul digestiv blochează esofagul (desen schematic) (din Niţulescu, 1955).

Puncţia splenică, deşi dă foarte bune rezultate în diagnostic, este o metodă cu riscuri, atît prin tehnica însăşi, cît şi prin starea bolnavilor. Leishmaniile apar incluse în mononucleare mari hipertrofiate, izolate sau în grupuri extracelulare, ca urmare a distrugerii celulelor gazdă. În leishmanioza viscerală, puncţia splenică dă rezultat pozitiv mergînd pînă la 100% în cazurile netratate.

Puncția hepatică este preferabilă celei splenice. Tehnica este mai ușoară și este mai puțin periculoasă. Rezultatele examenului sînt însă mai slabe, paraziții fiind mai puțin numeroși în ficat decît în splină.

Ganglionii limfatici sînt examinați sau prin puncție sau prin biopsie. Se preferă ganglionii hipertrofiați puternic. Totodată se obține și adenograma.

Puncția osoasă tinde să înlocuiască larg puncția splenică în diagnosticul leishmaniozei viscerale. Pentru obținerea măduvei de obicei se efectuează puncția sternală. Se poate de asemenea puncționa creasta iliacă, trohanterul sau o vertebră. La copii se execută puncția tibială. Leishmaniile apar incluse în celule mari endoteliale sau libere, izolate sau în grupuri. Unii autori sînt de părere că examenul frotiurilor medulare dă 77% rezultat pozitiv. Puncția osoasă este preferată pentru că ne oferă totodată tabloul elementelor medulare.

Cercetarea paraziților din *piele* se face în serozitatea obținută prin raclarea unei mici porțiuni (cu ajutorul unui vaccinostil se obține o zonă colorată în roz, fără sîngerare) sau prin aplicarea unui vezicator pe piele. Prezența paraziților în acest organ se explică prin proprietățile lor invadante asupra întregului sistem reticulo-endotelial. Aspectul și situația leishmaniilor este caracteristică. Paraziții apar izolați, cu conturul mai contractat, deseori atipici.

Pentru cercetarea paraziților în *mucoasa nazală* se raclează ușor suprafața cornetelor inferioare în mai multe puncte. Din cîteva fragmente de țesut se face un frotiu. Leishmaniile apar mai ales în elementele reticulo-endoteliale. Metoda de cercetare a mucoasei nazale pentru decelarea paraziților este însă discutată, atît din punctul de vedere al rezultatului, cît mai ales din punctul de vedere al traumei pe care o comportă asupra unui bolnav predispus la hemoragii.

Unii cercetători au identificat, prin culturi, leishmanii din *urină*.

Culturi ale *L. donovani* se pot obține prin însămînțarea produselor recoltate de la bolnav în medii speciale. Există nenumărate medii încercate pentru cultivarea leishmaniilor. Cel mai obișnuit mediu și cel care dă rezultatele cele mai bune este cel cu geloză și sînge, cunoscut sub numele de mediul NNN (Novy, Mc Neal și Nicolle). Acesta se obține din amestecul fără neutralizare de apă 900 ml, geloză 14 g, sare marină 6 g. Se repartizează în eprubete cîte 3 — 4 cm înălțime și se sterilizează la autoclav. Tuburile astfel pregătite pot să fie conservate mult timp la adăpost de uscăciune. În momentul în care vrem să cultivăm parazitul se pregătesc mediile adăugînd în fiecare eprubetă încălzită la 52° o cantitate de 1 ml sînge de iepure prelevat prin puncție aseptică din inimă sau din ureche. După repartizarea sîngelui în eprubete se amestecă ușor, rulînd tuburile în mînă. Tuburile se înclină, se lasă 12 ore la temperatura laboratorului pentru ca să se solidifice, apoi se mențin timp de 12 — 24 de ore la etuvă la 37°. Un mediu bine pregătit trebuie să aibă culoarea roșie-sîngerie și să fie transparent. Însămînțarea se face în apa de condensare. Eprubetele se păstrează la 18 — 20°. Culturile devin pozitive din ziua a 4-a — a 8-a și rămîn ca atare mai mult timp. Este bine să se facă treceri la 12 — 15 zile. Pentru examen se ia o picătură de lichid cu pipeta sterilă sau cu ansa și se face un frotiu. Pentru a evidenția conturul paraziților și flagelul este indicată colorația prin metoda Gram. Pentru detaliile de structură internă a parazitului se face colorația May-Grünwald-Giemsa. Paraziții apar în culturi sub forma de leptomonas cu un flagel bine reprezentat. Forma elementelor normale este alungită.

Pentru *inoculări la animale* se folosesc cîinele, hamsterul și popîndăul. Se inoculează intraperitoneal. La hamster, boala este mortală în 60 — 100 de zile, manifestîndu-se cu proliferare reticulo-endotelială splenică și hepatică.

Tot ca o metodă de diagnostic s-a preconizat hrănirea speciilor vectoare de flebotomi cu sînge periferic al unui suspect de leishmanioză și urmărirea ulterioară a infectării flebotomului. Este o metodă extrem de dificilă și aplicabilă numai în laboratoare de cercetări științifice.

Reacția de aglutinare cu culturi de *L. donovani* pe mediul solid a fost recomandată. Reacția pozitivă apare în mai puțin de 3 ore.

Reacția de fixare a complementului se impune ca o metodă deosebit de prețioasă, atît prin fidelitatea rezultatelor, cît mai ales pe considerentul că reacția este pozitivă chiar după primele săptămîni de boală. S-au preparat antigene din bacili acidorezistenți, din culturi de *L. donovani* sau din splină sau ficat de hamster infectat.

Inițial s-au folosit antigene din bacilul tuberculozei umane. Astăzi, folosindu-se anti-

Puncția hepatică este preferabilă celei splenice. Tehnica este mai ușoară și este mai puțin periculoasă. Rezultatele examenului sînt însă mai slabe, paraziții fiind mai puțin numeroși în ficat decît în splină.

Ganglionii limfatici sînt examinați sau prin puncție sau prin biopsie. Se preferă ganglionii hipertrofiați puternic. Totodată se obține și adenograma.

Puncția osoasă tinde să înlocuiască larg puncția splenică în diagnosticul leishmaniozei viscerale. Pentru obținerea măduvei de obicei se efectuează puncția sternală. Se poate de asemenea puncționa creasta iliacă, trohanterul sau o vertebră. La copii se execută puncția tibială. Leishmaniile apar incluse în celule mari endoteliale sau libere, izolate sau în grupuri. Unii autori sînt de părere că examenul frotiurilor medulare dă 77% rezultat pozitiv. Puncția osoasă este preferată pentru că ne oferă totodată tabloul elementelor medulare.

Cercetarea paraziților din *piele* se face în serozitatea obținută prin raclarea unei mici porțiuni (cu ajutorul unui vaccinostil se obține o zonă colorată în roz, fără sîngerare) sau prin aplicarea unui vezicator pe piele. Prezența paraziților în acest organ se explică prin proprietățile lor invadante asupra întregului sistem reticulo-endotelial. Aspectul și situația leishmaniilor este caracteristică. Paraziții apar izolați, cu conturul mai contractat, deseori atipici.

Pentru cercetarea paraziților în *mucoasa nazală* se raclează ușor suprafața cornetelor inferioare în mai multe puncte. Din cîteva fragmente de țesut se face un frotiu. Leishmaniile apar mai ales în elementele reticulo-endoteliale. Metoda de cercetare a mucoasei nazale pentru decelarea paraziților este însă discutată, atît din punctul de vedere al rezultatului, cît mai ales din punctul de vedere al traumei pe care o comportă asupra unui bolnav predispus la hemoragii.

Unii cercetători au identificat, prin culturi, leishmanii din *urină*.

Culturi ale *L. donovani* se pot obține prin însămînțarea produselor recoltate de la bolnav în medii speciale. Există nenumărate medii încercate pentru cultivarea leishmaniilor. Cel mai obișnuit mediu și cel care dă rezultatele cele mai bune este cel cu geloză și sînge, cunoscut sub numele de mediul NNN (Novy, Mc Neal și Nicolle). Acesta se obține din amestecul fără neutralizare de apă 900 ml, geloză 14 g, sare marină 6 g. Se repartizează în eprubete cîte 3 — 4 cm înălțime și se sterilizează la autoclav. Tuburile astfel pregătite pot să fie conservate mult timp la adăpost de uscăciune. În momentul în care vrem să cultivăm parazitul se pregătesc mediile adăugînd în fiecare eprubetă încălzită la 52° o cantitate de 1 ml sînge de iepure prelevat prin puncție aseptică din inimă sau din ureche. După repartizarea sîngelui în eprubete se amestecă ușor, rulînd tuburile în mînă. Tuburile se înclină, se lasă 12 ore la temperatura laboratorului pentru ca să se solidifice, apoi se mențin timp de 12 — 24 de ore la etuvă la 37°. Un mediu bine pregătit trebuie să aibă culoarea roșie-sîngerie și să fie transparent. Însămînțarea se face în apa de condensare. Eprubetele se păstrează la 18 — 20°. Culturile devin pozitive din ziua a 4-a — a 8-a și rămîn ca atare mai mult timp. Este bine să se facă treceri la 12 — 15 zile. Pentru examen se ia o picătură de lichid cu pipeta sterilă sau cu ansa și se face un frotiu. Pentru a evidenția conturul paraziților și flagelul este indicată colorația prin metoda Gram. Pentru detaliile de structură internă a parazitului se face colorația May-Grünwald-Giemsa. Paraziții apar în culturi sub forma de leptomonas cu un flagel bine reprezentat. Forma elementelor normale este alungită.

Pentru *inoculări la animale* se folosesc cîinele, hamsterul și popîndăul. Se inoculează intraperitoneal. La hamster, boala este mortală în 60 — 100 de zile, manifestîndu-se cu proliferare reticulo-endotelială splenică și hepatică.

Tot ca o metodă de diagnostic s-a preconizat hrănirea speciilor vectoare de flebotomi cu sînge periferic al unui suspect de leishmanioză și urmărirea ulterioară a infectării flebotomului. Este o metodă extrem de dificilă și aplicabilă numai în laboratoare de cercetări științifice.

Reacția de aglutinare cu culturi de *L. donovani* pe mediul solid a fost recomandată. Reacția pozitivă apare în mai puțin de 3 ore.

Reacția de fixare a complementului se impune ca o metodă deosebit de prețioasă, atît prin fidelitatea rezultatelor, cît mai ales pe considerentul că reacția este pozitivă chiar după primele săptămîni de boală. S-au preparat antigene din bacili acidorezistenți, din culturi de *L. donovani* sau din splină sau ficat de hamster infectat.

Inițial s-au folosit antigene din bacilul tuberculozei umane. Astăzi, folosindu-se antigene din alți bacili acidorezistenți se obțin 97 — 99% reacții pozitive de fixare a alexinei în leishmanioza viscerală. Utilizînd antigen leishmanian, rezultatele sînt mai slabe, reacția fiind pozitivă doar la 70% din cazurile de leishmanioză.

Diagnosticul prezumtiv al leishmaniozei se bazează pe tabloul sanguin și pe modificarea constantelor fiziologice ale organismului, modificări decelabile prin tehnici de laborator experimentate încă de multă vreme.

Reacția formol-gelificare sau formol-leucogelificare. Într-o eprubetă cu 1 ml ser sanguin se adaugă două picături de formol (formalină 40%). Reacția se consideră pozitivă dacă în cîteva minute pînă la maximum 30 de minute serul devine opac și apoi se gelifică luînd o culoare albă. Reacția prezintă dezavantajul că este nespecifică, se pozitivează tîrziu, în a 3-a — a 4-a lună de boală și este pozitivă doar la 3 sferturi din bolnavi. Potrivit datelor lui Ciun-Siun (1955), în Turkestan, la copiii pînă la 1 — 2 ani cu diagnostic sigur de leishmanioză reacția este negativă în 90% din cazuri.

Reacția de precipitare cu apă distilată este tot un test de disproteinemie nespecific, fiind pozitiv și în malarie, ca și în alte boli. Reacția se execută prin două tehnici diferite. Peste o mică cantitate de ser sanguin, în eprubetă, se adaugă încet pe pereții tubului o cantitate oarecare de apă distilată. La limita de separare ser-apă distilată apare un inel opalescent în cazuri pozitive. Al doilea procedeu tehnic constă în adăugarea în eprubetă, peste o cantitate de ser sanguin de la bolnav, a unei cantități de 2 — 3 ori mai mare de apă distilată. Reacția pozitivă este marcată de opacificare totală. Reacția se pozitivează la bolnavii de leishmanioză viscerală la fel de tardiv ca și reacția de gelificare cu formol, demonstrînd o creștere a unor fracțiuni globulinice. Reacția se poate executa cu 2 — 3 picături de sînge total, prelevat dela ureche, peste care se adaugă 10 picături de apă distilată. Reacția pozitivă este marcată de apariția unui precipitat noros. Cu sînge normal se obține o soluție limpede prin hemoliză.

Reacția uree-stibamină poate să se efectueze prin două tehnici: se fac diluții de ser pînă la 1/10. Se adaugă în fiecare tub o mică cantitate de soluție uree-stibamină 4%proaspăt preparată. Se consideră reacția pozitivă cînd la limita de separare a celor două lichide apare un inel gros de precipitare; a doua tehnică constă în diluarea unei picături de sînge recoltată din pulpa degetului, în 0,5 ml soluție oxalat de potasiu 2%, peste care se adaugă o picătură din soluția uree-stibamină 4%. Reacțiile pozitive sînt indicate de un nor gros floconos, foarte caracteristic.

Pentru decelarea tulburărilor privind proteinele sanguine pot de asemenea să fie utilizați reactivi ca trisulfura de arsenic și alții.

Reacția Takata-Ara este pozitivă, chiar în formele clinice fără atingere hepatică.

Electroforeza ne furnizează date extrem de importante în leishmanioză. Electroforetic se decelează o creștere marcată a globulinelor din fracțiunea γ, cu apariția unei fracțiuni specifice și o scădere a albuminelor. Raportul dintre globuline și albumine este inversat. O creștere atît de marcată a globulinelor dublată de scăderea albuminelor se întîlnește în patologia umană numai în mielomul multiplu. Caracterul curbei electroforetice se păstrează și în cazurile în care leishmaniile nu se pot identifica sau au dispărut o dată cu începerea unui tratament. Evoluția în timp a electroforegramei indică atitudinea terapeutică în cazurile confirmate, în sensul repetării unei cure terapeutice, în cazul unei electroforegrame staționare după tratament sau în sensul orientării spre alte cauze ale unei febre persistente după tratament, cînd totuși electroforegrama se modifică în bine. Vindecarea definitivă a leishmaniozei viscerale este confirmată numai de o curbă electroforetică normală.

Tabloul sanguin în leishmanioză se caracterizează prin importante modificări. Hematiile, inițial situate la o cifră ușor subnormală scad în perioada de stare a bolii la 2 000 000 — 2 500 000. La copil apar uneori hematii nucleate, numărul hematiilor putînd să ajungă sub 1 000 000.

Hemoglobina scade paralel, deci valoarea globulară este egală sau ușor inferioară unității.

Leucocitele scad înaintea hematiilor. Globulele albe pot să scadă sub 4 000, ajungînd la 2 000 — 3 000 sau chiar sub 1 000.

Formula leucocitară se caracterizează printr-o granulopenie marcată. Mononuclearele și limfocitele cresc. Numărul plachetelor sanguine scade o dată cu agravarea bolii și apariția sindromului hemoragipar. Urmărirea numărului lor este deosebit de valoroasă în cursul tratamentului. Se observă o creștere a numărului plachetelor printr-o curbă paralelă cu vindecarea bolii.

Reticulocitele pot să ajungă la 2 – 4%.

Mielograma din kala-azar se caracterizează printr-o predominanţă a celulelor reticulare. Reacţia eritroblastică este obişnuită. Celulele neutrofile polimorfonucleare sînt reduse, eozinofilele scad, şi paralel apare o reacţie a seriei eritroblastice. În formele cronice de leishmanioză, măduva sărăceşte în elemente, mai ales în seria mieloidă.

BOALA SOMNULUI

Trypanosoma gambiense, Trypanosoma rhodesiense

Boala somnului este o parazitoză gravă, datorită *T. gambiense* şi *T. rhodesiense*, şi răspîndită în Africa ecuatorială. Cele două tripanosome nu se deosebesc între ele din punct de vedere morfologic. Forma corpului este alungită, măsurînd 15 – 30 μ. Nucleul este central, membrana ondulantă mare. Paraziţii se găsesc în sînge, lichidul cefalorahidian, ganglionii limfatici, măduva oaselor ş.a. Tripanosomele se transmit prin înţepătura unor insecte diptere din genul *Glossina*. În vector, parazitul îşi schimbă forma de tripanosoma în forma de critidia. Clinic, boala evoluează în trei perioade: în faza iniţială, acută, infecţia se găseşte în sînge şi limfă şi se manifestă prin febră şi semne de alterare a stării generale; în faza următoare, tripanosomele invadează lichidul cefalorahidian şi se instalează o simptomatologie neuro-psihică; în faza finală a bolii, alterarea stării generale a organismului este extremă şi evoluţia este de obicei spre moarte. Diagnosticul de laborator al bolii somnului se bazează pe identificarea paraziţilor în sînge. Se examinează frotiuri de sînge colorate sau sedimentul din plasmă, după o triplă centrifugare. De asemenea se examinează produse recoltate prin puncţie din organe sau seroase. Se pot face culturi pe medii artificiale speciale sau inoculări la animale de laborator sensibile.

BOALA CHAGAS

Trypanosoma cruzi

Boala Chagas este datorită *T. cruzi* şi prezintă manifestări clinice foarte variate. Boala este răspîndită în America. Parazitul în sîngele omului este alungit, are 20 μ. Tot la om, parazitul se retrage intracelular, luînd forma de leishmania. Boala este transmisă de insecte din genul *Rodnius* şi *Triatoma*. În insectă, tripanosoma trece prin toate formele pînă la leishmanie, apoi se reîntoarce la forma iniţială, care este infectantă pentru om. Insecta se infectează în timpul prînzului sanguin. Boala se transmite omului prin contaminarea cu fecale de insecte. Tripanosomele străbat activ tegumentele omului. Boala Chagas are rezervorul între animalele sălbatice şi domestice. Focalitatea naturală a bolii este dovedită, boala putînd fi contractată în regiuni îndepărtate de aşezările omeneşti şi nevalorificate.

Diagnosticul bolii este dificil. Se cercetează sîngele în frotiu şi picătură groasă. Din produsele recoltate se pot face culturi sau inoculări la animale. Xenodiagnosticul, infectarea larvelor şi nimfelor vectorului dă rezultate bune.

GIARDIOZA

Giardia intestinalis

Sin. *Lamblia intestinalis*

Giardioza este o boală parazitară din ce în ce mai frecventă, manifestată prin tulburări privind tubul digestiv şi uneori căile biliare. Boala se transmite prin chisturi.

Morfologia parazitului. Formele vegetative (trofozoiţii) sînt piriforme, dimensiunile lor fiind între 10 şi 20 μ (15 μ) lungime şi 6 – 10 μ lăţime. Anterior prezintă o depresiune ca un fals citostom; posterior, parazitul este ascuţit (fig. 395). Citoplasma este fin granulară, fără vacuole digestive. Parazitul are doi nuclei mari, situaţi simetric în partea anterioară. Nucleii au un cariozom central mare. Blefa-

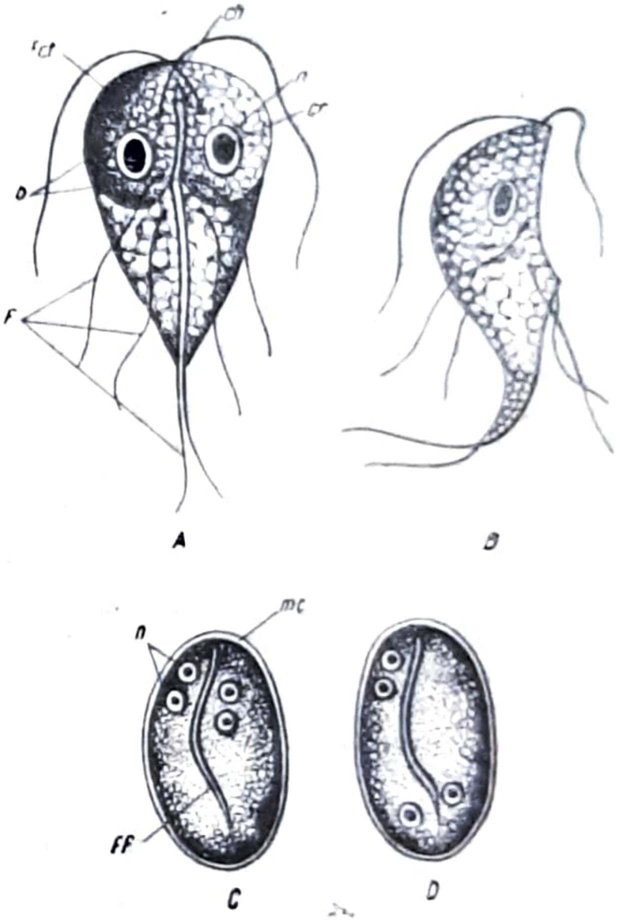


Fig. 395. – Giardia intestinalis.

A şi *B* – trofozoiţi; *C* şi *D* – chisturi; *n* – nuclei; *cr* – cariozom; *b* – blefaroplaşti; *f* – flagel; *ch* – chiasma flagelilor anteriori; *fcl* – fals citostom; *mc* – membrană chistică; *ff* – fascicul de flageli (Georgescu şi Steinbach ş.a., 1956).

roplaștii sînt izolați pentru fiecare flagel și dispuși în perechi în zona mediană internucleară. Din perechea de blefaroplaști anteriori pornesc doi flageli care străbat corpul în tot lungul lui și devin liberi la extremitatea posterioară a parazitului. Din perechea următoare de blefaroplaști pornesc doi flageli anteriori, care se încrucișează, formînd o chiasmă. Din cele două perechi de blefaroplaști posteriori pornesc simetric două perechi de flageli care devin liberi pe partea ventrală a parazitului, în zona mijlocie,

Chisturile sînt ovoide; au 8 — 12 μ. Membrana lor este fină, uneori distingîndu-se un dublu contur. Chistul are 2 — 4 nuclei rotunzi, situați simetric sau la unul din poli și un fascicul de flageli cu poziție oblică, ușor sinuoasă.

Ciclul biologic. În scaun se elimină chisturile. Chisturile, singura formă infecțioasă a parazitului, ajung în organismul omului cu alimentele sau apa poluată, sau prin intermediul mîinilor murdare. În intestin, parazitul se dechistează, iar formele vegetative rezultate se înmulțesc și încep eliminarea de chisturi, în perioade discontinue.

Rol patogen. Parazitul se localizează în jejun, de unde urcă în partea superioară a jejunului și în duoden. Uneori este găsit în colecist. Prezența giardiei în tubul digestiv duce la o iritație locală și la o stare toxică, cu repercusiuni generale uneori destul de mari. În prezent există în patologia tubului digestiv un interes din ce în ce mai crescut pentru acest parazit. Datorită complexității fenomenelor clinice pe care le provoacă, giardia trebuie căutată sistematic, prin examenul microscopic al scaunului, la orice bolnav intestinal.

Epidemiologie. Rezervorul de paraziți este omul. Se pare că lambliile animalelor din jurul omului, în special cele de la rozătoare, ar fi identice cu parazitul uman. În transmiterea bolii, rolul principal îl joacă condițiile de igienă ale îndepărtării dejectelor umane și posibil contactul omului cu elementele poluate cu dejectele animalelor. Chisturile de giardii sînt foarte rezistente la condițiile mediului extern, mai ales cînd umiditatea atmosferică și umezeala suportului sînt crescute. Chisturile se transmit prin zarzavaturi, fructe, apa poluată sau mecanic prin intermediul muștelor sau al mîinilor murdare. În sînul populației, lambliaza este mai frecventă printre copii.

Diagnosticul de laborator se bazează pe cercetarea parazitului în lichidul duodenal sau în scaun.

Examenul bilei. Recoltarea se face prin tubaj duodenal. Se examinează lichidul proaspăt, în 15—20 minute de la recoltare. Din sedimentul după centrifugare sau direct dintr-un flacon se face un preparat între lamă și lamelă și se examinează la microscop. În lichidul duodenal se văd trofozoiți caracterizați prin mișcările foarte vioaie de rostogolire, datorite acțiunii flagelilor. Parazitul este refringent. Cu obiectivul 7 (40 ×) se disting amănunte de formă și structură, în special prezența celor doi nuclei. În localizările joase, subduodenale, ale parazitului, examenul bilei poate să fie negativ și numai examenul coprologic repetat rezolvă diagnosticul. Pentru studiul amănuntelor morfologice ale parazitului se colorează frotiuri prin metoda May-Grünwald-Giemsa.

Examenul coprologic pune în evidență chisturile de giardii. Formele vegetative apar rareori în scaun și anume în mucusul scaunelor diareice sau după o purgație. Pentru cercetarea chisturilor se examinează fecalele prin metoda directă sau folosindu-se soluția Lugol, care colorează chisturile în brun. Cu obiectiv 3 (10 ×), chisturile apar perlate, refringente și foarte mici; pentru un examinator neexperimentat, chisturile se identifică destul de greu cu obiectivul mic și trebuie căutate cu atenție cu obiectivul 7, insistînd asupra fiecărui preparat. Cînd chisturile sînt rare, la suspecți sau în examenele de control după tratamentul giardiozei, examinarea se face după concentrare prin metoda Telemann-Langeron.

De o deosebită importanță este repetarea examenului coprologic, cînd rezultatul este negativ. Factori încă neprecizați determină întreruperi în emisiunea chisturilor, cunoscute sub numele de „perioade negative". De aceea, examenul coprologic trebuie repetat de 3—4 ori la interval de 7—10 zile.

Pînă de curînd, *G. intestinalis* era considerată un flagelat care nu se poate cultiva în laborator. Într-adevăr, pe medii obișnuite pentru paraziții intestinali, giardia nu se dezvoltă. Recent, Karapetian, în U.R.S.S. (1960), a reușit *cultivarea giardiei* pe culturi de țesuturi, fapt deosebit de important pentru perspectivele pe care le deschide în studiul biologiei acestui parazit.

TRICOMONOZA

Trichomonas vaginalis

Tricomonoza sau tricomonaza este o boală veneriană foarte răspîndită. Clinic boala se manifestă în special la femei, dar frecvența purtătorilor este ridicată și printre bărbați. Tricomonoza prezintă importanță, atît prin supărările pe care le provoacă, cît și prin rezistența la tratamentele folosite.

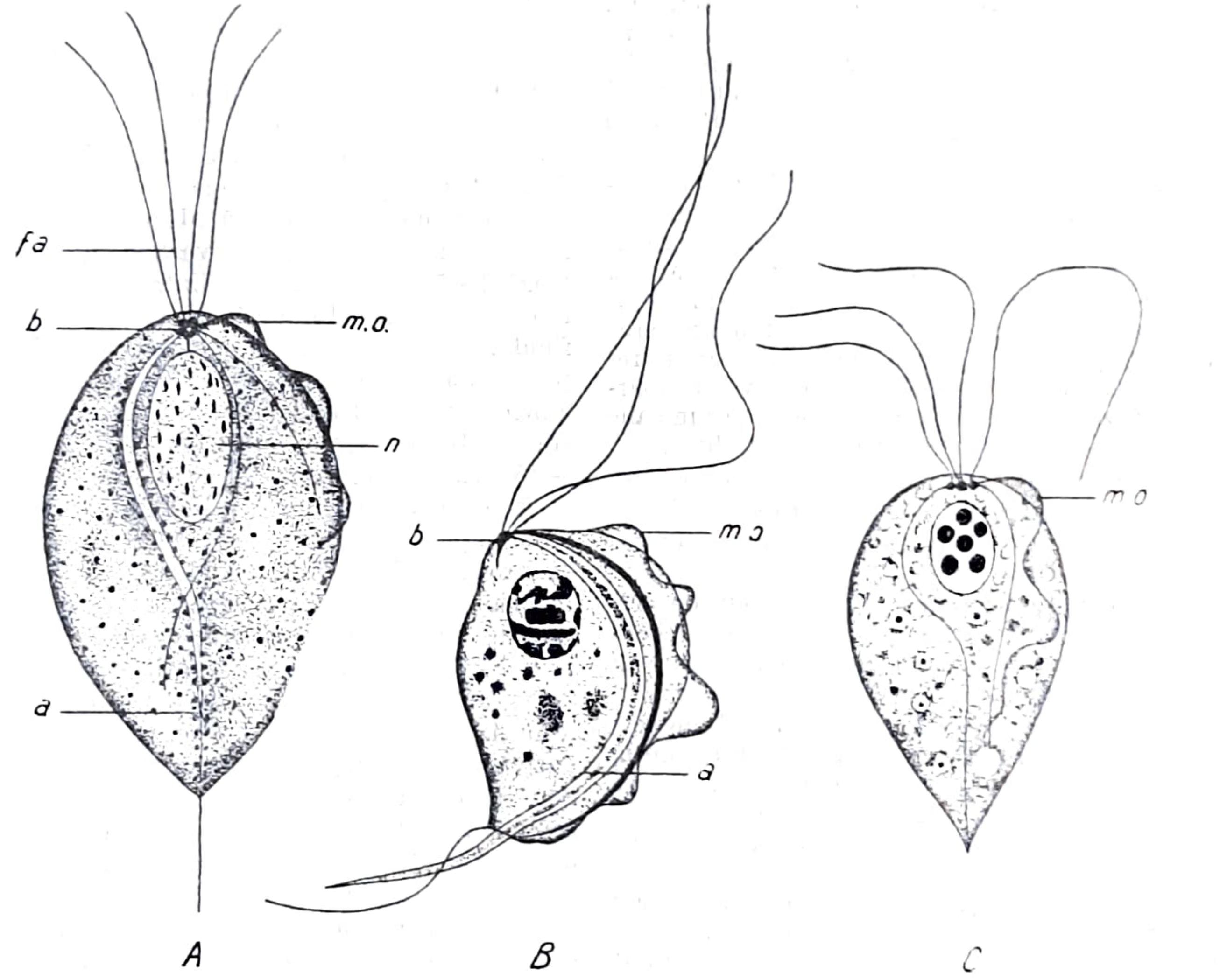


Fig. 396. — *Trichomonadidae* parazite ale omului.

A – *Trichomonas vaginalis*; *B* – *Trichomonas intestinalis*; *C* – *Trichomonas buccalis*; *n* – nucleu; *a* – axostil; *mo* – membrană ondulantă; *fa* – flageli anteriori; *fp* – flagel posterior; *b* – blefaroplaști (Belding, 1952; *A* – din Powel, 1936; *B* – din Cleveland, 1928 și *C* din Hinshaw, 1926).

Morfologia parazitului. Este un flagelat de 18–26 μ, piriform. Există și forme mai mari, ajungînd la 30 μ, ovalare. *T. vaginalis* este cunoscut numai ca trofozoit. Parazitul poate să-și modifice ușor forma corpului și prezintă deseori pseudopode. Pe fața considerată ventrală are un mic citostom. Citoplasma parazitului are o structură granulară. Nucleul este mare, situat anterior, ușor vizibil la parazitul viu în preparatele proaspete. Cariozomul este mic, întovărășit de granulații de cromatină. Anterior se găsesc blefaroplaștii într-o masă unică, nediferențiabili unul de altul prin metoda de colorare. Aparatul parabazal constă într-un corpuscul și o fibră. Flagelii în număr de 4 pornesc din grupul blefaroplaștilor și devin liberi la extremitatea anterioară a corpului; sînt lungi și mișcările lor sacadate imprimă parazitului mișcări vioaie în zig-zag. Tot din blefaroplast pornește dorsal, îndreptat posterior, un flagel care în drumul lui formează o membrană ondulantă (fig. 396). Membrana ondulantă are la bază o coastă de întărire, cu punct de plecare în blefaroplast. Rareori flagelul membranei ondulante poate să depășească extremitatea posterioară a parazitului, devenind liber. Mișcările lui sînt continue și determină formarea unui văl al membranei ondulante, văl care se distinge cu ușurință în preparatele proaspete. Tot din grupul blefaroplaștilor pornește către extremitatea posterioară, înconjurînd ventral nucleul, o formațiune de susținere, axostilul. Acesta este destul de gros și depășește în lungime corpul parazitului, ieșind afară prin extremitatea posterioară. Parazitul nu formează chisturi.

Rol patogen. Parazitul se localizează în vagin, unde determină o iritație a mucoasei cu secreții abundente și tulburări subiective, uneori destul de mari. Excepțional, parazitul poate să pătrundă în uter și anexe. În anumite împrejurări, parazitul poate să treacă în număr redus în circulația generală, așa cum a fost găsit recent de Gavrilescu (1959) la o bolnavă. La bărbat, parazitul se localizează în uretră sau în căile seminifere, trecînd deseori neobservat clinic.

Epidemiologie. Tricomonoza este considerată o boală veneriană, cu contagiu direct. Căile de transmitere indirecte prin apa de baie, rufe ș.a. sînt excepționale.

Diagnostic de laborator. Diagnosticul de certitudine al tricomonozei se bazează pe examenul direct al secreției între lamă și lamelă, examenul frotiurilor colorate și culturi.

Recoltarea se face cu ansa din fundul de sac vaginal posterior la minimum 24—48 de ore de la ultima spălătură sau tratament local. Nu se recoltează cu vată, pentru că reține paraziții. Din uretră se recoltează prin exprimarea pe cale vaginală cu indexul, după tamponare umedă cu soluție de oxicianură de mercur 1/4000 și tamponare uscată a meatului urinar. Din urină se examinează sedimentul, rezultatele fiind mult mai slabe, mediul salin urinar nefiind prielnic parazitului. La bărbat se examinează secreția uretrală, lichidul seminal și urina.

Examenul direct între lamă și lamelă se face imediat după recoltare. Paraziții se identifică în funcție de mărime, formă, prezența flagelilor și mișcările vioaie, sacadate, în zig-zag.

În *frotiurile colorate* prin metoda Romanovski se disting detaliile de structură ale parazitului.

Pentru *cultivarea* parazitului s-au imaginat nenumărate medii. În țara noastră, Panaitescu și Gavrilescu (1959) au pus la punct o metodă practică de cultivare a parazitului pe mediul Löffler. *T. vaginalis* cultivă în general mai greu decît *T. intestinalis* sau *T. bucalis*, necesitînd un anumit pH al mediului. În eprubete cu mediul Löffler proaspăt, înclinat, se adaugă peste lichidul de condensare o cantitate de ser fiziologic steril pînă la un nivel de 1/3 din înălțimea mediului în tub. Se adaugă o ansă de penicilină (aproximativ 4 000—5 000 u.) și dihidrostreptomicină (2 000—3 000 u.). Se așază eprubetele la frigider 24 de ore. Se corectează reacția lichidului cu acid clorhidric 10%, 1—2 picături zilnic, timp de 3—4 zile, păstrînd în acest interval mediile la 4°, pentru ca să se obțină pH 6 stabil, controlat cu hîrtie indicator universal. Se însămînțează 4—5 anse minimum dintr-o secreție cremoasă sau 10—15 picături dintr-o secreție fluidă. După însămînțare se agită bine eprubeta pentru omogenizarea secreției cu partea lichidă a mediului de cultură și se așază tubul la termostat la 37°. Controlul culturilor se face la 24—48—72 de ore. La 24 și 48 de ore, controlul se face după omogenizarea lichidului, recoltînd cu o pipetă Pasteur cîteva picături care se examinează la microscop între lamă și lamelă neîncălzite. Paraziții pot să fie trecător influențați de temperatura scăzută a lamei, în sensul unei inhibiții ușoare a motilității lor, după care își revin și pot să fie urmăriți vii timp de aproximativ o oră. După 72 de ore, la o cultură negativă se centrifughează lichidul 5 minute cu 200—300 de turații pe minut și se examinează sedimentul. Peste 72 de ore, o cultură negativă duce la un diagnostic negativ sigur. Rezultatul cultivării parazitului este superior examenului direct. Autorii romîni citați găsesc parazitul în examenul direct al secreției vaginale în 2/3 din cazurile la care culturile au fost pozitive. La bărbat, examenul direct dă rezultate mult mai slabe decît cultivarea parazitului. Din culturile inițiale se pot face cîteva treceri.

Inoculări la animale de laborator. La hamsterul auriu, inoculările intravaginale dau rezultat 100%. Versinskii (1908), Bogovski și Teras (1958) și alții au cercetat patogenitatea diferitelor tulpini prin inoculări intraperitoneale și intramusculare la șoarece.

FLAGELATE PARAZITE ALE TUBULUI DIGESTIV

(afară de *Giardia intestinalis*)

Trichomonas intestinalis

Morfologic. Parazitul este asemănător cu *T. vaginalis*. Cei cinci flageli sînt lungi, axostilul se exteriorizează posterior din corpul parazitului, iar flagelul recurent se prelungeşte după membrana ondulantă. Are dimensiunea de 10—20 μ (5—14 μ).

Rol patogen. Nu este binecunoscut. Parazitul se localizează în intestinul gros, fiind găsit uneori concomitent cu anumite tulburări locale.

Diagnostic de laborator. Se examinează fecalele prin metodele coprologice obişnuite. *Examenul direct* între lamă şi lamelă pune în evidenţă parazitul cu mişcările lui repezi. În scaunele neformate sau după o uşoară purgaţie, parazitul este mai vioi.

Parazitul cultivă mult mai uşor pe medii obişnuite decît *T. vaginalis*. Se folosesc pentru cultură medii lichide sau medii lichide cu un suport solid, asemănător celor pentru amibe, nefiind însă necesar adaosul de aliment figurat (amidon de orez), deoarece flagelatele intestinale nu-l utilizează. Ca medii lichide se folosesc amestecuri de ser sanguin sau ou în ser fiziologic. Mediile solide au la bază geloză sau ser coagulat acoperit cu ser fiziologic. Parazitul creşte abundent. Pentru obţinerea culturilor pure se încălzeşte mediul între 45 şi 47° în apă, ca să se distrugă amibele. Examinînd la 24—48 de ore lichidul dintr-o cultură, parazitul se recunoaşte uşor prin mişcările lui şi prin prezenţa flagelilor caracteristici.

Trichomonas bucalis

Morfologic, parazitul este foarte asemănător cu *T. vaginalis*, dar este mai mic (5—12 μ), membrana ondulantă este mai lungă. Citoplasma este foarte fin granulară.

Rolul patogen al parazitului nu este bine precizat. *T. bucalis* este considerat drept un comensal în carii dentare şi în criptele amigdaliene, dar uneori a fost identificat şi în abcesele pulmonare.

Diagnostic de laborator. Recoltarea materialului se face din tartrul dentar, carii, marginea gingiei sau criptele amigdaliene. Examenul se efectuează direct la microscop între lamă şi lamelă sau prin cultivarea parazitului pe medii obişnuite. Erori de diagnostic pot să aibă loc cînd la un examen direct între lamă şi lamelă celule ciliate bronşice sînt luate drept protozoare flagelate.

Chilomastix mesnili

Morfologie. Parazitul este ovalar, piriform, cu extremitatea anterioară mai rotunjită, iar posterior se subţiază progresiv şi se răsuceşte în jurul axului lui (fig. 397). Are 10—20 μ. Prezintă antero-lateral un şanţ citostomal oblic, cu un orificiu citostomal la extremitatea posterioară

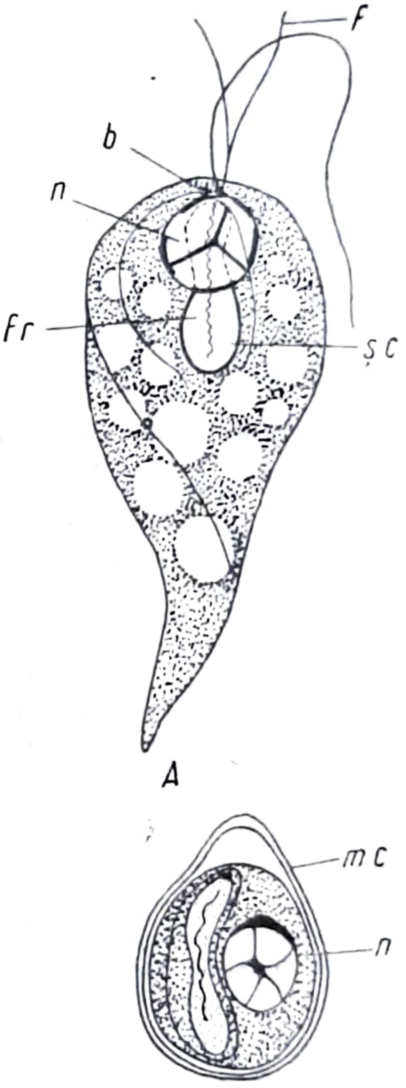


Fig. 397. — Chilomastix mesnili.

A — trofozoid; *B* — chist; *n* — nucleu; *şc* — şanţ citostomal; *b* — blefaroplaşti; *f* — flageli liberi; *fr* — flagel recurent; *mc* — membrană chistică (din Craig şi Faust 1953, modificat).

a șanțului, către mijlocul parazitului. Nucleul este mare, rotund, situat anterior. În fața nucleului se găsesc 6 blefaroplaști, dispuși cîte 3 în două rînduri. Din blefaroplaștii anteriori pornesc 3 flageli lungi, liberi. Din blefaroplaștii așezați în imediata vecinătate a șanțului citostomal pornesc două fibre rigide, care întăresc marginile șanțului citostomal și îl mențin deschis în permanență, precum și un flagel recurent scurt, situat chiar în șanțul citostomal și al cărui rol este antrenarea prin mișcările lui a particulelor alimentare din jur.

Chistul este mic, de 5—10 μ, ovalar, sau piriform, cu o membrană dublă. Are un singur nucleu, un blefaroplast, o schiță a șanțului citostomal cu flagelul recurent.

Rol patogen. Parazitul, localizat în intestinul gros, este în general incolin. *C. mesnili* nu rămîne însă totdeauna indiferent față de organismul omului, agravînd uneori enterocolite de altă natură sau putînd să provoace prin el însuși iritații intestinale și tulburări de tranzit gastro-intestinal, manifestate prin perioade de diaree.

Diagnostic de laborator. Examenul coprologic direct sau cu soluție Lugol pune în evidență chisturile, care se examinează cu obiectivul 3 și 7. Formele vegetative într-un scaun diareic se identifică prin mișcările în linie dreaptă ale parazitului, mișcări caracteristice de rostogolire într-o parte, în timpul cărora șanțul citostomal apare și dispare în poziția lui oblică. Erori de diagnostic pot să aibă loc cînd flagelatele coprofile, ale căror chisturi au ajuns în scaun direct din mediul extern, sau trecînd prin tubul digestiv al omului, sînt confundate cu flagelatele parazite intestinale.

Chilomastix mesnili cultivă ușor, mai ales pe un mediu foarte simplu alcătuit dintr-un strat înclinat de geloză cu clorură de sodiu, acoperit cu o soluție de ser fiziologic. Amibele intestinale cresc greu pe acest mediu.

Flagelate coprofile

Se consideră flagelate coprofile sau coprozoice flagelatele neparazite. identificate la om prin examene coprologice. Chisturile acestor flagelate sînt aduse cu alimentele în tubul digestiv, trec nealterate prin intestin, se deschistează și se înmulțesc rapid în fecale înaintea eliminării acestora din organism. Fecalele reprezintă de fapt mediul de cultură pentru aceste flagelate și pot să se contamineze cu chisturile flagelatelor coprozoice chiar după emisiune, în mediul extern. Printre flagelatele coprozoice, cele mai frecvente aparțin genurilor *Bodo* și *Cercomonas*.

CLASA SPOROZOARE

Sporozoarele sînt protozoare care nu au organe de locomoție, sînt parazite intracelulare cel puțin o parte din viața lor, se înmulțesc prin generații asexuate (schizogonice) și sexuate (sporogonice).

Două mari grupe au importanță pentru parazitologia umană.

Ordinul *Coccidii* se caracterizează prin alternarea generațiilor sexuate și asexuate la aceeași gazdă. La om s-au descris coccidii din genul *Eimeria* și *Isospora.*

Ordinul *Hemosporidii* are generațiile sexuate și asexuate alternativ la două gazde, dintre care una este considerată gazda definitivă și cealaltă vectorul. Hemosporidiile sînt adaptate la viața parazitară intracelulară în celulele țesuturilor fixe și în globulele roșii ale sîngelui. Toate speciile parazite pentru om aparțin familiei *Plasmodide*, genul *Plasmodium* : *P. vivax, P. malariae, P. falciparum* și *P. ovale.*

În timp ce paraziții din ordinul *Coccidii* sînt rareori întîlniți la om, nu același lucru se întîmplă cu cei din ordinul *Hemosporidii.* Malaria, boală în etiologia căreia intră speciile genului *Plasmodium*, reprezintă un capitol de primă importanță în patologie și epidemiologie.

COCCIDIOZA

Coccidioza este o boală rară la om, cu manifestări digestive și evoluție benignă.

Isospora belli

Morfologie. Ciclul schizogonic al parazitului este necunoscut, oochiștii fiind singura formă identificată a parazitului. Forma oochiștilor este ovalar-alungită, cu un capăt mai îngust, gîtuit, unde se găsește micropilul. Dimensiunile oochistului sînt : 20—33 μ lungime și 10—19 μ lățime. Peretele este dublu, neted, incolor și subțire (fig. 398).

Oochiștii identificați îndată după emisiunea lor în scaun, prezintă în interior o masă granulară sferică, nedivizată, cu un nucleu. În fecale, evoluția oochistului continuă. Se divid nucleul și protoplasma, rezultînd două celule-fiice, *sporoblaștii.* Sporoblaștii își formează un perete chistic devenind *sporochist*, de 12—14 μ lungime. În interiorul sporochiștilor apar 4 *sporozoiți*, lungi, subțiri, persistînd încă o parte din masa granulară a sporochistului.

Ciclul evolutiv. După toate probabilitățile, oochistul matur, ingerat de om, liberează sporii în intestin. Aceștia pătrund în celulele epiteliale ale peretelui intestinal, încep diviziunea schizogonică și eventual sporogonică. Formarea gametociților, maturarea lor, fecundarea și formarea oochistului se petrec în lumenul intestinal. Oochiștii rezultați se elimină cu scaunul, se maturează în mediul extern și o dată ingerați de altă persoană, ciclul evolutiv reîncepe.

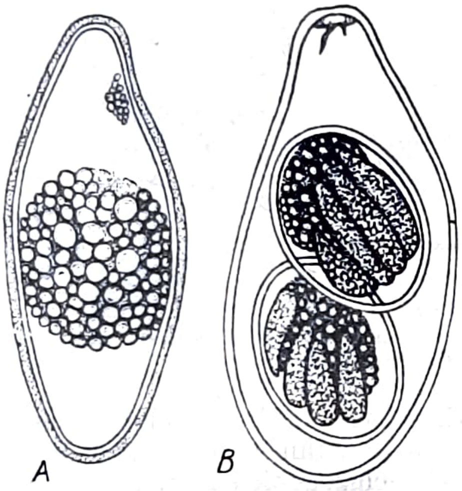


Fig. 398. — Isospora belli. Oochiști.
A — oochist nesegmentat; *B* — oochist segmentat (disporocistid tetrazoic). *a* — sporochist; *b* — sporozoit (Doflein și Reichenow, 1953, din Dobell).

Rol patogen. Coccidiile se localizează în intestinul subțire al omului, în special în ileonul terminal și probabil în cec. Coccidioza intestinală este o boală benignă. Incubația clinică este scurtă de 6—8 zile; boala durează 2—3 săptămîni, cu o simptomatologie digestivă moderată, după care bolnavul se însănătoșește.

Radacovici și Duport (1956) au descris primul caz de coccidioză umană în țara noastră.

Diagnostic de laborator. *Examenul microscopic direct* al materiilor fecale între lamă și lamelă pune în evidență oochiștii. Examenul după colorare cu soluție Lugol este mai indicat. În materiile proaspete, cu obiectivul 3, oochiștii apar sub forma unor mici formațiuni, în care se disting membrana și masa germinativă centrală. Cu obiectivul 7 se observă dublul contur al oochistului și detalii asupra blocului central. În acest stadiu este greu de diferențiat în funcție de dimensiune sau formă oochiștii de isospore ca și cei de eimerii. Numai evoluția ulterioară ne duce pe calea identificării precise. Astfel, după 24—48 de ore, oochiștii de *Isospora belli* prezintă clar în interior cei doi sporoblaști sau sporochiști. Ulterior se observă cei 4 sporozoiți în fiecare sporochist. În general, oochiștii în scaun sînt rari. De aceea examenul microscopic trebuie efectuat cu multă atenție și este bine să se folosească obiectivul 7. Uneori oochiștii sînt atît de transparenți, încît pot să treacă ușor neobservați.

Colorații permanente ale oochiștilor nu se pot obține.

Examenul după concentrare. Se folosesc metode indicate pentru chisturi de protozoare.

Culturi de coccidii pe medii artificiale în laborator nu se pot obține. În scop diagnostic se urmărește totuși maturarea oochiștilor de *I. belli*, în fecale amestecate cu cărbune.

Inoculările la animalele de laborator nu au dat rezultate.

Erori de diagnostic microscopic pot să aibă loc, cînd în scaun apar oochiști de coccidii nespecifice omului, așa-numite coccidii de trecere pătrunse în tubul digestiv o dată cu alimentele. Diferența se remarcă prin faptul că oochiștii de *Isospora belli* nu sînt segmentați.

De asemenea, o dietă alimentară potrivită elimină oochiștii de trecere din scaun.

Isospora hominis

Morfologie. Ooochiștii sînt asemănători sau mai mici decît cei de *I. belli.*

Diferența netă între cele două specii constă în faptul că oochiștii de *I. hominis* sînt tipic maturați la eliminarea din organism, prezentînd sporochiști formați. Ciclul evolutiv este asemănător în parte cu cel al *I. belli.* Se pare că segmentarea oochiștilor în scaun ar fi datorită unei dezvoltări a acestora în subepiteliu, de unde ulterior ajung în lumenul intestinal.

Rol patogen și diagnostic de laborator aceleași ca ale *I. belli.*

Eimeria gubleri

Morfologie. Oochiștii de eimerii au 4 sporochiști, fiecare cu cîte 2 sporozoiți (fig. 399). Dimensiunea oochiștilor este 50 µ.

Rol patogen. Parazitul se localizează în ficat, în canalele biliare. Coccidioza hepatică a omului este excepțional de rară. Se pare că este o infecție cu *E. stiedae*, coccidie hepatică a iepurelui.

Diagnosticul de laborator este același cu al coccidiozei intestinale.

Erori de diagnostic pot să intervină cînd coccidii de trecere prin tubul digestiv se identifică în scaun. Oochiștii acestora, ingerați o dată cu alimentele, sînt însă maturi, avînd 4 sporochiști în interior, fiecare conținînd cîte 2 sporozoiți falciformi. Printre coccidiile de trecere sînt *E. stiedae* de la iepure și *E. clupearum* și *E. sardinae* de la pești. Examenul microscopic coprologic după o dietă alimentară corespunzătoare rezolvă diagnosticul.

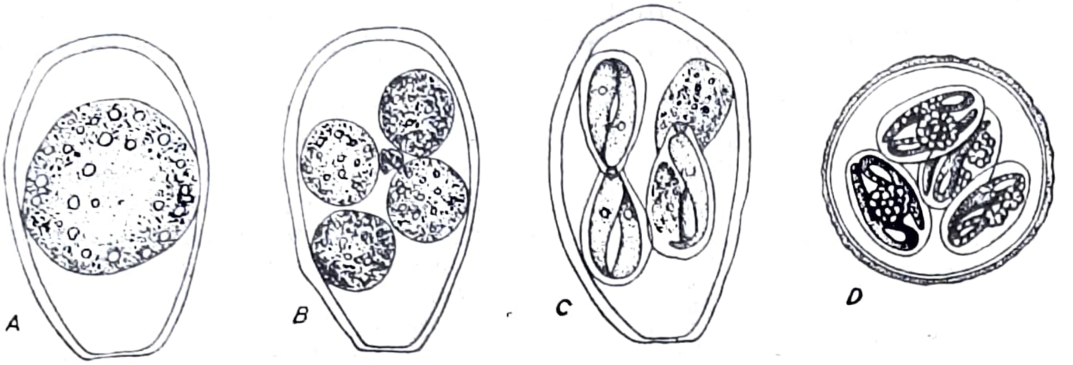


Fig. 399. — Oochiști de eimerii.

A, B, C — ***Eimeria stiedae*** **nesegmentat (*A*), segmentat (*B*), segmentat cu sporozoiți (tetrasporocistid dizoic) (*C*); *D* — *Eimeria clupearum* (× 1 600) (*A, B, C*, Neveu-Lemaire, 1948 din Wasielewski; *D*, Doflein și Reichenow, 1913, din Wenyon.**

MALARIA

Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale.

Malaria este o infecție datorită unor protozoare din clasa *Sporozoare*, familia *Plasmodidae*. Boala se caracterizează prin febră, splenomegalie și anemie. Omul este gazda definitivă a paraziților, boala transmițîndu-se prin insecte diptere din familia *Culicidae*, genul *Anopheles*. Prin vasta arie de răspîndire a bolii pe glob, prin indicele de morbiditate crescut, prin multitudinea și gravitatea formelor clinice, malaria este una dintre cele mai importante boli parazitare și în același timp o problemă mondială de sănătate publică de prim ordin.

Parazitul malariei trece în evoluția lui prin trei faze cunoscute sub numele de ciclul asexuat exoeritrocitar, ciclul asexuat eritrocitar și ciclul sexuat sau sporogonic (fig. 400).

În fiecare ciclu, parazitul prezintă anumite particularități morfologice și biologice. Primele două cicluri se întîlnesc la om, al treilea începe la om și se desăvîrșește în insecta vectoare, țînțarul anofel femel.

Ciclul exoeritrocitar. Multă vreme s-a considerat că sporozoiții inoculați la om de anofel pătrund în hematii, unde încep evoluția, înmulțindu-se treptat în perioada de incubație a bolii.

Cercetări experimentale au dovedit însă că sporozoiții pătrunși în sînge dispar repede din circulație, pătrunzînd în celulele tisulare hepatice, unde încep diviziunea schizogonică, asexuată. Acest ciclu schizogonic exoeritrocitar sau tisular începe a doua zi de la inoculare. Parazitul se dezvoltă, începe diviziunea nucleară, iar nucleul celulei gazde este împins la o parte. Parazitul ajuns la maturitate are dimensiunea de 30—100μ și dă naștere la mai multe mii de merozoiți, elemente parazitare fiice. Celula gazdă se rupe, iar merozoiții rezultați din schizogonie pătrund în hematii sau se reîntorc în celulele parenchimatoase hepatice pentru ca să continue ciclul schizogonic exoeritrocitar.

P. vivax are ciclul tisular de 8 zile. Are vacuole în protoplasmă, fiecare parazit într-o celulă hepatică dă naștere la aproximativ 10 000 de merozoiți. Formele schizogonice tisulare pot să persiste cîteva luni și sînt răspunzătoare de recăderile clinice.

P. falciparum se caracterizează prin schizonți cu suprafața lobată, datorită creșterii parazitului în toate direcțiile. Nu prezintă vacuole. Parazitul evoluează în 6 zile, la maturitate are 60 μ și dă naștere la aproximativ 40 000 de merozoiți. Se pare că *P. falciparum* prezintă un singur ciclu schizogonic exoeritrocitar, după care toți merozoiții invadează hematiile.

P. malariae. Nu se cunosc încă formele schizogonice tisulare, dar existența lor este certă, deoarece numai astfel se explică durata și evoluția bolii.

În cursul evoluţiei schizogonice în ficat nu s-a constatat nici o reacţie inflamatoare din partea organismului. Îndată ce se rupe celula gazdă şi merozoiţii sînt puşi în libertate ia naştere un puternic aflux leucocitar.

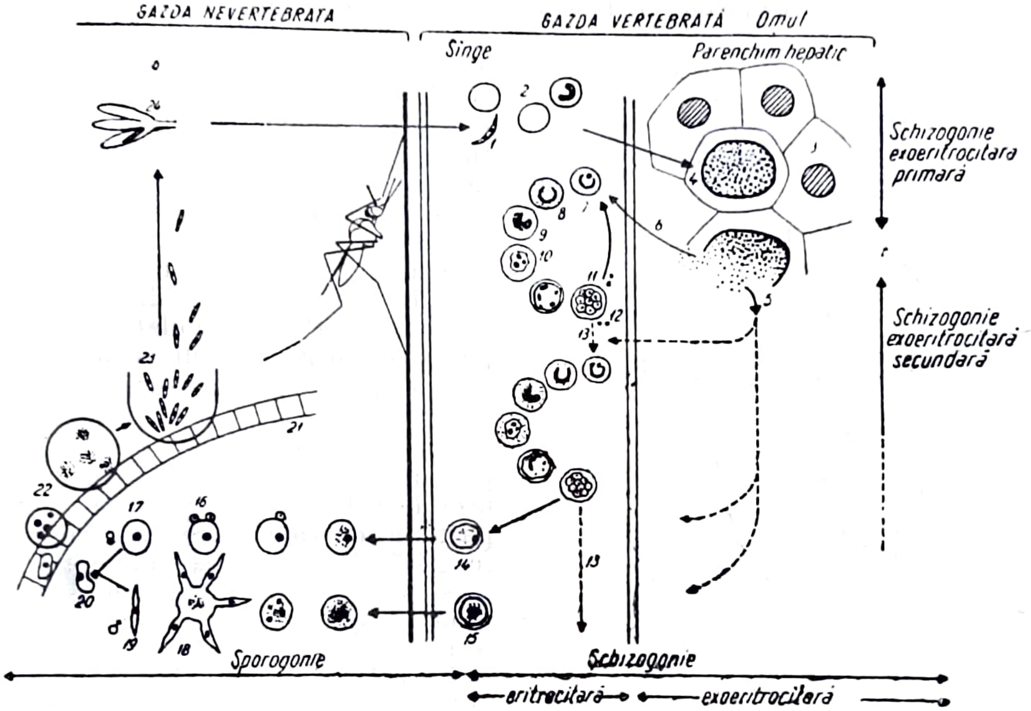


Fig. 400. — Ciclul evolutiv al *Plasmodium vivax*.

1 — sporozoid inoculat de ţînţarul anofel; 2 — hematii şi leucocite; 3 — celule parenchimatoase hepatice; 4 — forme schizogonice din ciclul exoeritrocitar (faza preeritrocitară); 5 — macromerozoiţi (merozoiţi histiotropi); 6 — micromerozoiţi (merozoiţi hemotropi); 7-9 — trofozoiţi (7—8 — inele; 9 — amibă); 10—11 — schizonţi (prerozetă şi rozetă); 12 — merozoiţi; 13 — cicluri schizogonice în singe; 14 — macrogametocit; 15 — microgametocit; 16 — maturarea macrogametocitului; 17 — macrogamet; 18 — exflagelarea microgametocitului; 19 — microgamet; 20 — oochinet; 21 — peretele stomacal al anofelului femel; 22 — oochist; 23 — sporozoiţi; 24 — glanda salivară a anofelului.

Dintre merozoiţii rezultaţi din schizogonia tisulară se numesc macromerozoiţi cei care vor invada alte celule hepatice şi micromerozoiţi cei care vor invada hematiile.

Ciclul eritrocitar. Acest ciclu eritrocitar este asexuat sau schizogonic. Ciclul începe o dată cu pătrunderea micromerozoiţilor în torentul sanguin (fig. 401 şi 402). Dezvoltarea parazitului are loc în hematiile din circulaţia periferică pentru *P. vivax* şi *P. malarie*. Ciclul eritrocitar al *P. falciparum* are loc tot în hematii, o parte în circulaţia periferică, iar restul în capilarele din viscere.

Plasmodium vivax este agentul patogen al febrei terţe benigne. Evoluţia se petrece în 48 de ore de la pătrunderea parazitului în hematie şi pînă la eliberarea merozoiţilor rezultaţi din diviziunea lui. Într-un frotiu colorat conform tehnicii May-Grünwald-Giemsa, parazitul, iniţial, are forma unui inel, cu diametrul de 1/3 din mărimea globulului roşu. Prezintă o granulaţie cromatică (nucleul), rotundă, roşie-brună. Citoplasma este inelară, de culoare albastră, mai subţire spre granulaţia cromatică şi puţin mai groasă în partea opusă sau laterală. Golul inelului este o vacuolă mare rotundă. Datorită formei citoplasmei, mai groasă într-o parte, acest stadiu al parazitului a primit numele de inel cu pecete. După aproximativ 12 ore, parazitul începe să se deformeze prin apariţia unor pseudopode care apar în partea opusă nucleului. Este stadiul de *inel deformat*. Vacuola centrală se păstrează. În corpul parazitului apar granulaţii de pigment melanic sau malaric. Hematia începe să crească, iar în ea apar granulaţii mici, cărămizii-brune, numeroase, caracteristice acestei specii. Sînt granulaţiile Schüffner. Stadiul

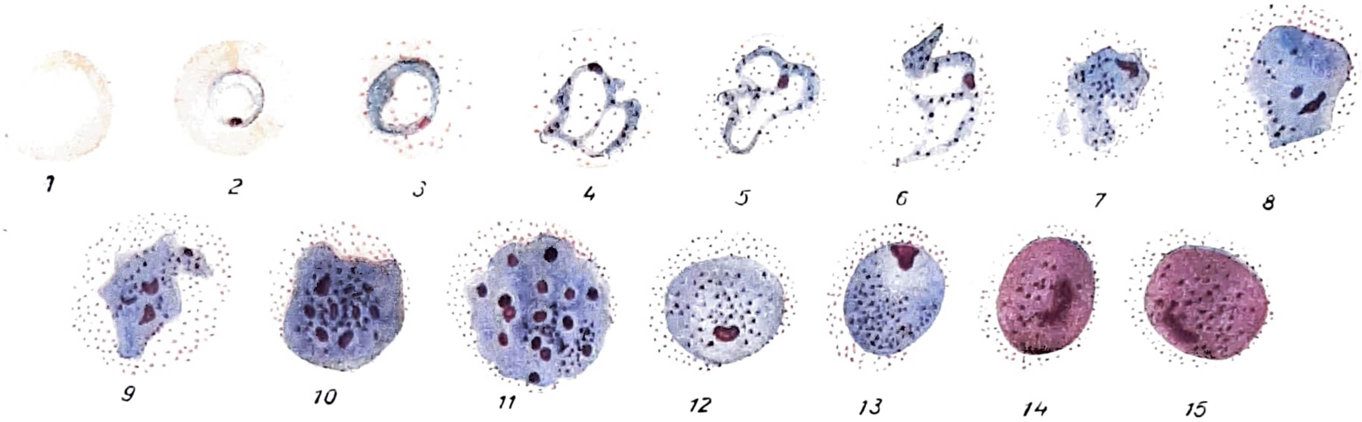

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

Fig. 401. — Plasmodium vivax.
1 – hematie normală; 2 – 7 – trofozoiţi (inele şi amibe); 8 – 11 – schizonţi (prerozete şi rozete); 12 – 13 – macrogametocit; 14 – 15 — microgametocit.

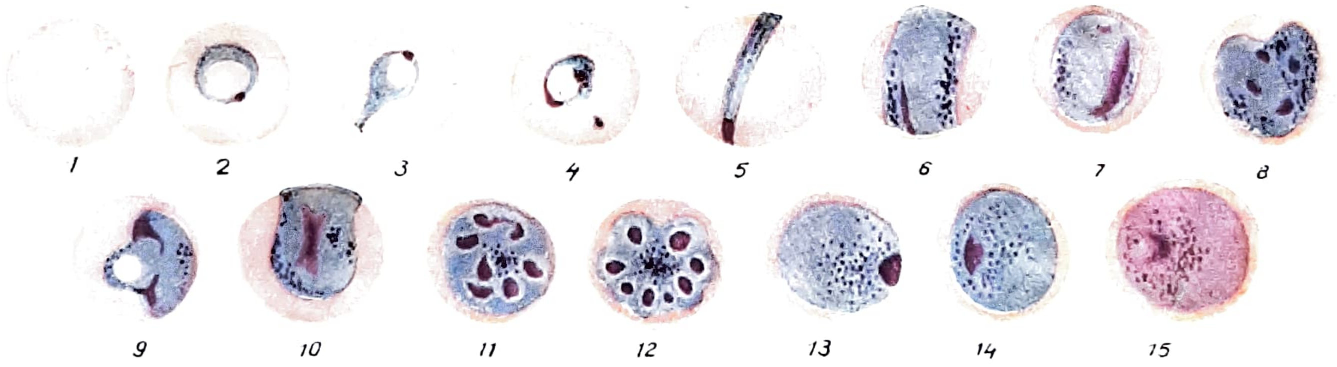

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

Fig. 402. — A — Plasmodium malariae.
1 – hematie normală; 2 – inel; 3 – 11 – forme schizogonice; 12 – rozetă; 13 – 14 – macrogametocit; 15 — microgametocit.

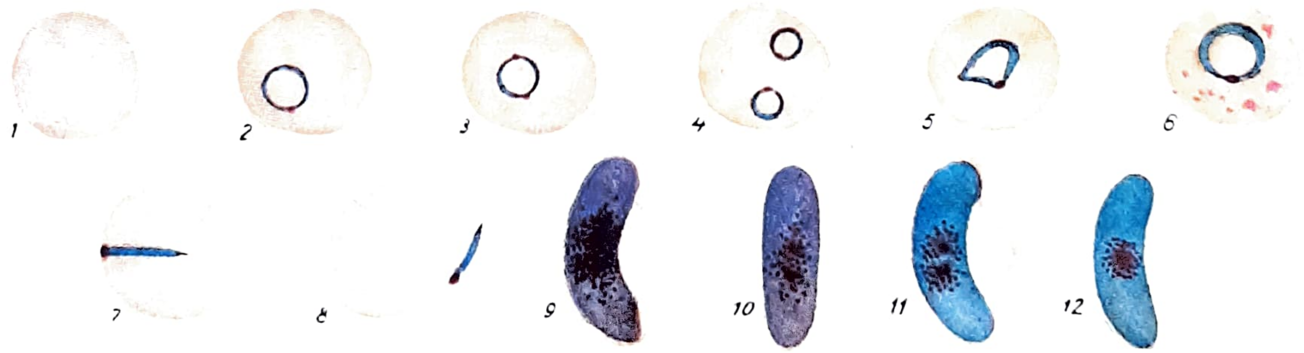

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Fig. 402 — B — Plasmodium falciparum
2 – 8 – inele (6 – petele Maurer); 9 – 10 – microgametocit; 11 – 12 – macrogametocit

următor, cunoscut sub numele de *amibă*, este caracterizat prin apariția pseudopodelor în toate direcțiile, parazitul crește, vacuola se micșorează, nucleul nu mai este perfect rotund. Ulterior, parazitul dezvoltîndu-se umple aproape întreaga hematie, care apare ca un chenar slab colorat plin de granulații Schüffner. Este stadiul de *schizont*, cînd alveola dispare și nucleul începe să se dividă. Nucleul se divide în multe mase de cromatină, citoplasma rămîne nedivizată. Este stadiul de *prerozetă*. În sfîrșit, în ultimul stadiu denumit *rozetă*, în jurul nucleilor, în număr de 14—26, deveniți rotunzi, se individualizează o porțiune de citoplasmă. Elementele nou-apărute se numesc *merozoiți*. Ei se așază pe mai multe planuri în jurul unei mase de *citoplasmă reziduală*, în care se adună granulațiile de pigment malaric. Aspectul general a dat rozetei de *P. vivax* numele de corp muriform. Cînd rozeta este completă, hematia se rupe, merozoiții se eliberează în torentul sanguin și vor pătrunde fiecare în cîte o hematie. Resturile rămase din parazit sînt fagocitate de leucocite, în care pigmentul se poate observa sub forma unor mase aglomerate.

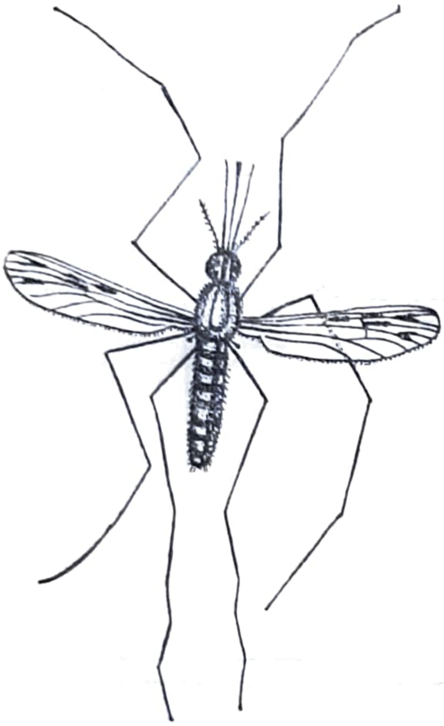


Fig. 403. — Anopheles maculipennis femelă, × 4 (din Neveu-Lemaire, 1943).

Formele sporogonice în sîngele circulant sînt reprezentate de gametociți. Ei iau naștere tot din merozoiți și apar după mai multe cicluri asexuate. Gametociții se deosebesc net de elementele parazitare ale seriei schizogonice, prin forma lor rotundă sau ovalară și nucleul unic. Hematia este hipertrofiată și prezintă aceleași alterații. *Gametocitul femel* sau *macrogametocitul* are citoplasma intens colorată în albastru. Nucleul mic, compact, colorat în roșu, bine delimitat, la elementele mature este de obicei situat marginal și are forma triunghiulară. Granulațiile de pigment malaric sînt fine și dispuse uniform. *Gametocitul mascul* sau *microgametocitul* are citoplasma violet-roșcată. Nucleul este mare, ocupă mai mult de jumătate din parazit, are cromatina difuză. Pigmentul malaric, alcătuit din granulații mai mari, este dispus în grămezi în jurul nucleului.

Plasmodium malariae este agentul patogen al febrei cuarte, ciclul de dezvoltare a formelor sporogonice durînd 72 de ore. În faza de inel, parazitul nu se poate deosebi de *P. vivax*. În faza de inel deformat, parazitul devine de obicei piriform, cu vacuola redusă. Amiba este caracteristică. Parazitul este alungit într-un singur sens, mai subțire sau mai gros, ajungînd la o formă dreptunghiulară dispusă în bandă ecuatorială. Nucleul este alungit. Pigmentul melanic, închis colorat, în granule mai mari, este înșirat în linii drepte, mai ales pe marginile parazitului. În colorațiile obișnuite, hematia este normal colorată, fără granulații.

Schizontul este de obicei rotund sau dreptunghiular, mai mic decît o hematie, cu citoplasma mult mai compactă decît la *P. vivax*.

Nucleul parazitului începe să se dividă, păstrînd forma liniară. Ia naștere la sfîrșit o rozetă cu 8—12 merozoiți, așezați pe un singur plan în jurul citoplasmei reziduale în care se adună și pigmentul.

Gametociții sînt asemănători cu cei ai *P. vivax*, dar se deosebesc prin dimensiunile lor mai mici decît ale hematiei.

Plasmodium falciparum este agentul etiologic al febrei terțe maligne, cea mai gravă formă de malarie. În sîngele periferic apar de obicei numai inele. Restul elementelor seriei schizogonice evoluează în capilarele viscerale. Inelul este foarte fin și mic, diametrul lui fiind 1/5—1/6 dintr-o hematie normală. Inelul are una sau două granulații cromatice opuse sau apropiate. Vacuola este mare. Inelele mai evoluate seamănă cu cele de *P. vivax* sau *P. malariae*. Uneori se pot găsi două inele în aceeași hematie. Parazitul poate să ia forma de bastonaș. Se pot observa paraziți așezați la marginea hematiei, încît par situați în afară. Hematia parazitată are dimensiuni obișnuite sau poate să fie chiar mai contractată. În hematia parazitată se pot observa uneori formațiuni caracteristice, denumite petele lui Maurer. Acestea sînt mari, colțuroase, uneori tringhiulare, colorate în violet-roșcat. Sînt puține la număr și nu apar în toate hematiile parazitate, deosebindu-se net prin structura lor de granulațiile Schüffner întîlnite în hematiile parazitate cu *P. vivax*. Stadii mai avansate ale schizogoniei se întîlnesc excepțional de rar în sîngele periferic și numai în formele grave de malarie.

Gametociții de *P. falciparum* apar obișnuit în sîngele periferic și au forma caracteristică semilunară, depășind dimensiunile unei hematii. Din hematia parazitată se poate observa uneori o mică porțiune în concavitatea gametocitului, dînd imaginea unei toarte de coșuleț. *Macrogametocitul* este mai mare și mai net semilunar. Citoplasma este colorată în albastru, iar nucleul mic, roșu, situat central, cu granulații de pigment în jur. *Microgametocitul* este ceva mai mic, cilindric, cu extremitățile mai rotunjite. Citoplasma are culoarea violet-roșcată, nucleul este mare, difuz colorat în roșu. Pigmentul melanic este dispus în grămezi în tot corpul gametocitului, dar mai ales în jurul nucleului.

Plasmodium ovale este o specie mediteraneană, neidentificată pînă în prezent în țara noastră. Morfologia și stadiile evolutive ale schizogoniei au caractere comune între *P. vivax* și *P. malariae*. Astfel, asemănător cu *P. malariae*, rozeta are 12 merozoiți, dar hematia este hipertrofiată și prezintă granulații Schüffner.

Plasmodium wilsoni este o specie africană, care seamănă sau este identică cu *P. vivax*. Formele tinere sînt asemănătoare cu *P. ovale*, avînd mișcări amiboide reduse. Parazitul nu se dispune în bandă ecuatorială. Hematia este foarte hipertrofiată. Se poate observa parazitismul multiplu al unei hematii.

Ciclul sexuat, sporogonic. Ciclul sexuat se desăvîrșește în țînțarul anofel femel (fig. 403). Macrogametocitul, după ce suferă un proces de reducere nucleară, devine *macrogamet*. Microgametocitul trece printr-un proces mai complicat de exflagelare, ca rezultat al diviziunii nucleului și individualizării unei porțiuni de citoplasmă în jurul fiecărui nucleu. Iau naștere mai mulți *microgameți* alungiți, cu mișcări vii. Macrogametul este fecundat de microgamet, nucleii se contopesc, alcătuind un *sincarion*. Oul rezultat este vermicular, mobil și poartă numele de *oochinet*. Oochinetul pătrunde în peretele stomacal, devine imobil și se numește *oochist*. Oochistul mai păstrează încă pigment rămas din elementele sexuate inițiale, pigment care se orientează într-un anumit mod pentru fiecare specie de plasmodiu. Oochistul se dezvoltă, crește în dimensiuni, bombind pe suprafața stomacului către cavitatea generală.

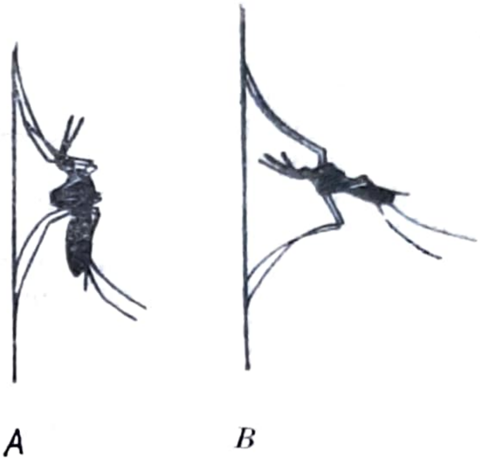


Fig. 404. — Culex (A) și *Anopheles* (B) în poziție de repaus (din Brumpt și Neveu-Lemaire, 1951).

După mai multe diviziuni nucleare iau naștere *sporozoiții*, iar întreaga formațiune se numește *sporochist*. Sporozoiții sînt alungiți, fuziformi, cu unul sau mai multe grăunțe de cromatină. Sporochistul se rupe, iar sporozoiții liberați ajung cu limfa țînțarului în glandele salivare. În momentul în care țînțarul va înțepa din nou va introduce o dată cu salivă și sporozoiți în plagă. Astfel are loc infectarea omului cu parazitul malariei.

Rol patogen. Malaria este o boală cu evoluție îndelungată, caracterizată prin perioade acute cu accese febrile și intervale de vindecare aparentă.

Malaria se caracterizează clinic prin acces febril, anemie și splenomegalie. Accesul febril, corespunzător perioadei de rupere a rozetelor și împrăștiere a merozoiților, începe cu un frison puternic, urmat de o ascensiune termică bruscă, ajungînd la 40—41° și se sfîrșește cu scăderea temperaturii, însoțită de transpirații profuze. Accesele febrile au un ritm caracteristic, în funcție de specia de parazit. În infecțiile cu *P. vivax*, accesul se repetă din două în două zile, în infecțiile cu *P. malariae* din trei în trei zile. Infecțiile cu *P. falciparum* au deseori o febră continuă cu accese zilnice, temperatura corpului nescăzînd la normal între accese. Cînd perioada de accese febrile se termină, urmează o perioadă de acalmie, după care bolnavul prezintă recăderi, boala luînd din nou forma acută. După un număr de recăderi, boala poate să se sfîrșească prin vindecare. Moartea poate să survină la un moment dat în evoluția bolii, mai ales după un număr de recăderi.

Malaria prezintă foarte multe forme clinice, dintre care unele sînt deosebit de grave, ca formele pernicioase hiperpiretice, meningiene, comatoase, algide, febra bilioasă hemoglobinurică și altele. Infecțiile și suprainfecțiile cu paraziți conduc de obicei la formele de malarie cronică, care îmbracă uneori tabloul de cașexie malarică, caracterizată prin anemie și hepato-splenomegalie marcate, o stare de depresiune mintală și o scădere mare a rezistenței organismului.

Evoluția malariei și unele aspecte ale endemo-epidemiei bolii au condus pe malariologi spre cercetarea imunității în malarie. În malarie există fenomene imunologice în cursul bolii, denumite de Sergent premuniție și de Moșkovski infecție compensată. Pe lîngă această imunitate concomitentă, malaria lasă bolnavului un anumit grad de imunitate reziduală. Manifestările imunității reziduale în malarie au un caracter deosebit. Ele au fost amplu studiate în țara noastră de acad. M. Ciucă. Cercetările școlii romînești au dus la concluzia existenței unei imunități particulare în malarie după dispariția paraziților din organism, imunitate legată de specia de *Plasmodium*.

Epidemiologie. Rezervorul de paraziți în malarie este omul purtător de gametociți. Boala se transmite printr-un vector reprezentat prin mai multe specii de insecte din ordinul *Diptere*, familia *Culicidae*, genul *Anopheles* (fig. 404). Aria vastă de răspîndire a malariei pe glob este determinată de condițiile orohidrografice și climaterice care asigură existența vectorului și transmiterea bolii. De o deosebită importanță sînt condițiile economico-sociale în evoluția endemiei palustre. În țara noastră, aria de răspîndire a malariei este legată de distribuția insectei vectoare *Anopheles maculipennis*. După îndelungate cercetări, G. Zotta a identificat trei aspecte ale paludismului în funcție de fiziografia regiunii, tipul de extindere a cuiburilor larvare și rasa de anofeli predominantă : ***paludismul marilor zone de inundație*** cuprinzînd valea Dunării, pînă la Brăila și cursul inferior al Siretului și Prutului, și caracterizîndu-se printr-o endemicitate moderată a malariei și predominanța rasei *A. maculipennis messeae*; ***paludismul liniilor interioare*** de-a lungul rîurilor din sudul și estul țării, în care endemia palustră prezintă o mare extindere, iar rasa predominantă este *A. m. atroparvus*; ***paludismul litoralului marin***, în jurul lacurilor salmastre sau mai dulci, în care paludismul a prezentat caractere hiperendemice, ca vectori predominînd *A. m. atroparvus* și *A. m. elutus*. În prezent, printr-o largă acțiune de combatere, inițiată și susținută de stat, epidemiile puternice de malarie și situația paludismului endemic din țara noastră au rămas de domeniul trecutului și ne găsim în faza de eradicare a paludismului. Oprirea transmiterii paludismului și suprimarea rezervorului de paraziți în țara noastră sînt posibile numai în condițiile noi în care se duce astăzi munca de ocrotire a sănătății populației.

În faza actuală a eradicării malariei în țara noastră, lupta împotriva bolii se bazează pe descoperirea purtătorilor de paraziți. Acest deziderat se realizează prin examenul sîngelui în picătură groasă, recoltat de la toți febrilii care se prezintă în unitățile de asistență medicală sau care sînt depistați activ de cadrele medico-sanitare la domiciliu.

Această acțiune cu caracter de masă, impune o examinare judicioasă și calificată a lamelor de sînge pentru diagnosticul malariei, precum și un număr crescut de specialiști în problemă.

Paludismul, care reprezenta în trecut un adevărat flagel, a ajuns astăzi o boală în dispariție. Școala romînească de malariologie ilustrată de numele profesorilor M. Ciucă, Gh. Zotta, Gh. Lupașcu, E. Ungureanu, D. Cornelson și alții, printr-o intensă muncă de cercetare științifică și de teren și-a cîștigat astăzi o experiență și un renume mondial.

Diagnosticul de laborator al malariei constă practic în identificarea parazitului în sîngele periferic. Metodele de diagnostic prezumtiv și serologic au importanță mai mult teoretică.

Diagnosticul de certitudine constă în identificarea parazitului în sînge proaspăt, frotiu și picătură groasă, colorate în sînge după concentrare, sau în identificarea parazitului în produsele recoltate prin puncții din organism.

Examenul sîngelui proaspăt între lamă şi lamelă pune în evidenţă agentul bolii prin prezenţa pigmentului malaric pe fondul galben-palid al hematiei şi prin mişcările parazitului în faza de amibă. Precizarea speciei de parazit se bazează pentru *P. vivax* pe hipertrofierea hematiei parazitate, mobilitatea pseudopodelor şi structura în bastonaşe a pigmentului, pentru *P. malariae* pe dimensiunile normale ale hematiei parazitate, mobilitatea mai redusă şi pigmentul în grunji de culoare mai închisă spre brun, iar pentru *P. falciparum* pe identificarea gametociţilor cu forma caracteristică şi pigmentul situat central. Rareori în sîngele periferic examinat proaspăt se văd leucocite melanifere. Erorile se datoresc interpretării drept paraziţi a unor vacuole sau structuri atipice ale hematiei, sau a unor hematii îndoite sau privite pieziş şi prezentînd un aspect falciform.

Examenul sîngelui în frotiu subţire colorat prin metoda May-Grünwald-Giemsa ne oferă posibilitatea studierii amănunţite a paraziţilor malariei. Caracteristic pentru *P. vivax* sînt hipertrofierea şi colorarea palidă a hematiilor parazitate, prezenţa granulaţiilor Schüffner, forma neregulată, uneori de aspect zdrenţuit a protoplasmei din stadiul de amibă şi rozeta prin numărul şi dispoziţia merozoiţilor. Identificarea *P. malariae* se bazează pe dimensiunile şi colorabilitatea normală ale hematiei parazitate, dispoziţia în bandă ecuatorială a amibei, pigmentul malaric închis de culoare dispus în general liniar şi marginal, şi numărul şi orientarea merozoiţilor în rozetă. Pentru *P. falciparum*, în sîngele periferic se întîlnesc numai inele şi gametociţi caracteristici. În formele grave de malarie cu *P. falciparum* pot să apară în sîngele periferic şi alte elemente aparţinînd ciclului schizogonic. Se apreciază că un examen corect al frotiului comportă examinarea a cel puţin 200 de cîmpuri microscopice.

Examenul frotiului în strat subţire dă posibilitatea să se aprecieze numeric densitatea parazitară, calculînd procentual hematiile parazitate faţă de cele neparazitate şi raportînd cifra găsită la numărul de hematii dintr-un milimetru cub de sînge. O dată cu identificarea parazitului, examinarea frotiului de sînge ne permite să stabilim formula leucocitară şi să surprindem alteraţii ale hematiilor neparazitate şi eventual leucocite melanifere sau hematii cu punctaţii bazofile.

Examenul sîngelui în picătură groasă colorată prin metoda Giemsa dă posibilitatea identificării mai rapide a paraziţilor în cazul unei densităţi reduse a acestora. Picătura trebuie să fie suficient de groasă. În acest sens este indicat ca majoritatea cîmpurilor microscopice, folosind obiectivul cu imersie, să aibă cel puţin 20 de leucocite. În aceste condiţii, stratul de sînge este de aproximativ de 50 de ori mai gros ca frotiul subţire. Pentru infirmarea diagnosticului de malarie se examinează cel puţin 100 de cîmpuri microscopice. Durata totală de examinare nu depăşeşte astfel 4—5 minute. Nu trebuie să fie neglijate marginile picăturii groase, pentru că în această zonă se găsesc deseori gametociţi de *P. falciparum* şi *P. vivax*. În cazul surprinderii unui element suspect se examinează cele două picături groase recoltate pe lamă, de la un capăt la altul, neţinînd seamă de zonele mai slab colorate sau mai subţiri. Drept sursă luminoasă este indicată lumina artificială electrică sau de la o lampă de petrol cu presiune, sau eventual lumina solară reflectată pe un fond alb. Se evită lumina naturală a cerului, deoarece culoarea albastră este atît de puternică, încît anulează în mare măsură valoarea coloraţiei.

În picătură groasă, *P. vivax* se identifică prin mărimea parazitului, multitudinea şi forma neregulată a amibelor, coroana de granulaţii Schüffner rămasă după hemoliza hematiei şi prin caracteristicile rozetei; *P. malariae* prin dimensiunea şi eventual intensitatea colorării parazitului, culoarea închisă a pigmentului şi prin aspectul rozetei. În general, în cazul malariei cu *P. malariae*, numărul rozetelor în sînge este deosebit de ridicat; *P. falciparum* se identifică prin prezenţa exclusivă a inelelor ca reprezentanţi ai seriei schizogonice sau a gametociţilor. Uneori în picătură groasă pot să apară paraziţi distruşi în parte. Astfel din parazit pot să fie întîlnite resturi de protoplasmă, granulaţii nucleare sau numai pigmentul malaric. Culoarea, dispoziţia şi dimensiunile blocului sau coroanei de pigment pot să constituie elementul unic, dar suficient în diagnosticul paludismului.

Erori de diagnostic pot să aibă loc cînd artefacte sau fragmente celulare sînt interpretate drept paraziţi. De asemenea elemente supraadăugate (coci, micete etc.) pot să prezinte unele asemănări cu paraziţii malarici, dar o cercetare a structurii lor (absenţă îndeosebi a pigmentului malaric) şi a dispoziţiei pe lamă (în general sînt grupate în serie, mai multe la un loc) rezolvă diagnosticul.

Metodele de concentrare a paraziţilor prin centrifugări şi spălări succesive ale sîngelui heparinat sau metoda mobilizării paraziţilor prin contracţia splinei cu adrenalină administrată parenteral nu au intrat în practica curentă a diagnosticului malariei.

Examenul măduvei oaselor, recoltată prin puncţie sternală, nu dă rezultate superioare examinării sîngelui periferic pentru decelarea paraziţilor.

Au fost încercate *reacţia de fixare a complementului* şi *reacţia intradermică*, folosind ca antigen plasmodii aviare.

Culturile de paraziţi în sînge au numai interes teoretic.

Ca metode de orientare în diagnosticul malariei au fost indicate *reacţia de floculaţie serică* cu melanină coroidiană sau diverse săruri ferice. De asemenea, a fost studiată *hidro-serofloculaţia*. Reacţiile nu au specificitate, fiind pozitive şi în alte afecţiuni febrile.

Tabloul sanguin se caracterizează printr-o diminuare accentuată a numărului de hematii. Apar alteraţii de formă, dimensiuni şi colorabilitate sau hematii cu punctaţii bazofile şi elemente imature ale seriei roşii.

În perioadele acute, mai ales după accesul malaric, se înregistrează o leucocitoză mergînd pînă la 15 000 — 20 000 de elemente/mm³, cu monocitoză uneori marcată. În formele cronice se instalează leucopenia.

În măduva oaselor se observă o reacţie normoblastică sau megaloblastică, alterări ale megacariocitelor, şi hematii parazitate. Pigmentul malaric este abundent, atît intracelular, în macrofage melanifere, cît şi extracelular.

TOXOPLASMOZA

Toxoplasma gondii

Toxoplasmoza este o boală din ce în ce mai frecventă, cu manifestări clinice variate şi o epidemiologie foarte puţin cunoscută.

Toxoplasma este un gen cu loc încă neprecizat între protozoare. Majoritatea parazitologilor o consideră ca făcînd parte din ordinul sporozoarelor.

Morfologie. *Toxoplasma gondii* este un parazit de forma unui corn alungit şi uşor încovoiat, de 4—6 μ lungime. Unul dintre capete este rotunjit. În coloraţia Romanovski, nucleul apare roşu, situat central sau deplasat spre partea rotunjită, cu un cariosom. Tot în citoplasmă se află şi o formaţiune denumită corp paranuclear sau parabazal. Citoplasma apare colorată în albastru palid.

Rol patogen. *T. gondii* este agentul unei boli grave a omului. Toxoplasmoza congenitală este o cauză a mortinatalităţii şi a unor tulburări grave neuropsihice din copilărie. Toxoplasmoza acută sau cronică poate să îmbrace diferite forme în funcţie de organul atins. Parazitul se găseşte intracelular în orice sistem de celule din organism, cu predilecţie în ţesutul nervos şi în ochi. Paraziţii liberi se întîlnesc în lichidele din seroase, după distrugerea celulei gazdă (fig. 405).

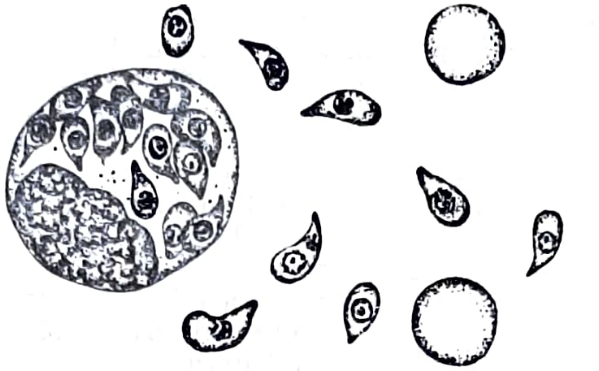


Fig. 405. — *Toxoplasma gondii.* Exsudat peritoneal de şoarece. Paraziţi intra- şi extracelulari.

Epidemiologie. Rezervorul de paraziţi este constituit de animale. Deosebit de importantă este existenţa formelor inaparente de boală şi a purtătorilor sănătoşi care răspîndesc parazitul în jur. Eliminarea toxoplasmelor din organism are loc prin diferite căi. Calea de pătrundere în organism este neprecizată. În ţara noastră, boala a fost identificată în 1953.

Diagnostic de laborator. *Punerea în evidenţă a parazitului* se poate face în sînge, urină, spută, lichidul cefalorahidian. Din lichide se examinează microscopic sedimentul între lamă şi lamelă. În frotiurile de sînge paraziţii se întîlnesc foarte rar. Paraziţii pot să fie identificaţi în probe recoltate prin biopsie din organe (ficat, ganglioni limfatici, piele etc.).

Reacţiile serologice sînt un sprijin preţios în diagnostic.

Reacţia Sabin-Feldman este un test colorimetric de neutralizare pe lamă. În ţara noastră, reacţia a fost încercată şi pusă la punct de Radacovici, în 1954. Principiul reacţiei constă în proprietatea protoplasmei toxoplasmelor să se coloreze intens cu albastru de metilen în mediu alcalin. În contact cu ser de bolnav în diluții diferite, toxoplasmele își pierd această proprietate. Toxoplasmele vii se obțin din exsudatul peritoneal de șoarece, în ziua a patra de la inoculare. Produsul diluat 1/5 cu ser uman heparinat 1/4 000 se amestecă cu diluții în serie din serul suspectului de toxoplasmoză. Se păstrează timp de o oră la 37°. Pe lame se pun 0,02 ml amestec și 0,01 ml soluție albastru de metilen 0,25% tamponat la pH 11 și se acoperă cu lamele. Se numără la microscop elementele libere colorate și necolorate, după 10 minute. Reacția se consideră pozitivă cînd 50%din toxoplasme rămîn necolorate în diluții de ser peste 1/16—1/24.

Reacția de fixare a complementului, deși dă uneori rezultate mulțumitoare, este considerată de Radacovici și Atanasiu (1959) drept inferioară testului colorimetric.

Reacția intradermică cu toxoplasmin, deși nu este legată de metodele de laborator, trebuie menționată pentru valoarea ei diagnostică.

Inoculările la animale de laborator (șoarece, cobai, hamster auriu) sînt deosebit de valoroase. Produsul de cercetat se inoculează pe cale intracerebrală sau intraperitoneală.

PNEUMOCYSTIS CARINI

P. carini este un parazit cu loc neprecizat în sistematică. Se consideră că ar face parte dintre sporozoare. Stadiile tinere au 2—4 μ mărime și prezintă un nucleu central. Formele sporogonice sînt sferice, au 5—7 μ, o membrană subțire și un număr de 2—4—8 nuclei. După diviziunea nucleului are loc diviziunea protoplasmei. Paraziții au fost observați în alveolele pulmonare. Boala pe care o determină este o pneumonie gravă. Infecția își are izvorul probabil printre animale, rozătoarele jucînd rolul principal. Calea de transmitere a bolii este aerogenă.

CLASA CILIATE

Ciliatele sînt protozoare care prezintă pe suprafața corpului cili vibratili cu ajutorul cărora se deplasează. În mod obișnuit se înmulțesc asexuat. În funcție de mărimea, uniformitatea și poziția cililor, clasa ciliatelor se împarte în patru ordine. *Balantidium coli*, singurul ciliat parazit al omului, face parte din ordinul *Heterotrichi*, care se caracterizează prin cili inegali ca lungime.

BALANTIDIOZA

Balantidium coli

Balantidioza sau dizenteria balantidiană este o boală rară, cu gravitate clinică variată și tratament dificil.

Morfologia parazitului. *Forma vegetativă* este mare, de 50—200 μ lungime și 40—70 μ lățime. Parazitul prezintă în jurul peristomului cili foarte dezvoltați, iar pe restul membranei cili mici, așezați în rînduri oblice față de axul corpului. Anterior și ventral, parazitul are un *șanț peristomal*, în fundul căruia se află *citostomul*. În jurul peristomului, cilii au o lungime mai mare. Posterior se observă orificiul anal, *citoproctul*. Citoplasma este granulară. Ectoplasma este foarte subțire. În endoplasmă se găsesc diferite vacuole, printre care două *vacuole pulsatile* mari. Tot în endoplasmă, central, se află aparatul nuclear alcătuit din *macronucleu*, reniform, și *micronucleu*, sferic, situat în concavitatea macronucleului (fig. 406).

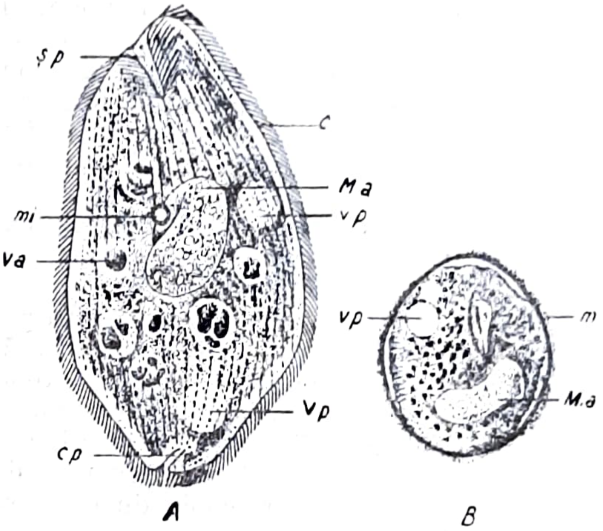


Fig. 406. — Balantidium coli.

A — forma vegetativă; *B* — chist; *Ma* — macronucleu; *mi* — micronucleu; *c* — cili; *șp* — șanț peristomal; *vp* — vacuolă pulsatilă; *va* — vacuolă alimentară; *cp* — citoproct; *m* — membrană chistică (din Predtecenski, 1960, modificat).

Chisturile sînt ovalare sau rotunde, mari, ajungînd la 50—60 μ. Au un perete dublu. În chist se găsește un singur parazit. Chisturile au deci un singur macronucleu.

Ciclul biologic. Parazitul se înmulțește în intestin prin diviziune binară transversală; s-a descris de asemenea și o diviziune sexuată. Chisturile se elimină o dată cu materiile fecale în mediul extern, unde rămîn viabile multă vreme. Ajunse cu alimentele sau apa poluată în organismul uman, chisturile vor da naștere în intestinul gros unor trofozoiți, parazitul continuînd astfel evoluția lui. Pe baza constatării că forma vegetativă a parazitului, eliminată din organismul uman, poate să trăiască cîteva zile la temperatura camerii s-a emis ipoteza că boala s-ar putea transmite şi cu ajutorul acesteia. Ipoteza este susţinută de date experimentale, care arată că trofozoiţii ingeraţi de cobai trec nevătămaţi prin stomacul animalului şi ajung în intestin.

Rol patogen. *B. coli* este un parazit incolin, care trăieşte în colon. În anumite împrejurări, *B. coli* poate să devină agentul cauzal al unei boli grave, dizenteria balantidiană. Anatomopatologic, boala se caracterizează prin formarea unor ulceraţii profunde şi întinse în intestinul gros şi ileonul terminal. Afecţiunea este greu vindecabilă.

Epidemiologic. Balantidium, parazit frecvent al porcului, este considerat drept specie identică cu parazitul omului. Ocazional, *B. coli* este identificat la om, mai ales la persoanele care pot să se infecteze de la porci. În ţara noastră, Ungureanu şi Boldescu (1953) confirmă rolul porcului ca rezervor de paraziţi pentru om.

Diagnostic. Trofozoiţii pot să fie identificaţi în scaunul diareic sau într-un fragment de mucus, la examenul microscopic direct între lamă şi lamelă.

Chisturile pot să fie identificate în scaunele formate sau păstoase, prin examenul microscopic direct sau prin metoda de concentrare Telemann.

Uneori apar la examenul coprologic direct ciliate coprofile sau coprozoice. Acestea nu sînt parazite, ci se dezvoltă în fecale, unde chisturile au ajuns direct sau prin alimentele ingerate. Între speciile mai des întîlnite sînt *Balantidium minutum* şi alte ciliate din diferite genuri. În general, dimensiunile trofozoiţilor acestor ciliate sînt mult mai reduse decît ale *B. coli.*

Culturi de *B. coli* se obţin pe mediile artificiale pentru cultivarea amibelor, adăugîndu-se ca aliment figurat amidonul de grîu, sau pe medii cu ser sanguin steril diluat 1/10 în soluţie Ringer cu adaos de amidon de orez, paraziţii crescînd în porţiunea joasă a tuburilor.

ÎNCRENGĂTURA *PLATHELMINŢI*

Viermii din încrengătura *plathelminţi* se caracterizează prin turtirea lor dorso-ventrală, simetria bilaterală şi lipsa cavităţii generale.

În general nu au tub digestiv şi sînt hermafrodiţi.

Plathelminţii se împart în două clase : *trematode* şi *cestode.*

Trematodele sînt viermi paraziţi cu corpul bine individualizat, fără cili, majoritatea sînt hermafrodiţi şi prezintă un tub digestiv incomplet şi una sau mai multe ventuze, dintre care o ventuză situată perioral. În general, larvele ieşite din ou au cili. Trematodele se caracterizează în evoluţie prin alternarea mai multor generaţii în două sau mai multe gazde.

Acestei clase îi aparţin mai multe specii endoparazite ale omului. Dintre acestea fac parte *Fasciola hepatica* şi *Fasciolopsis buski* (familia *Fasciolidae*, trematode distomate, cercari închistaţi în apă sau pe vegetale), *Dicrocoelium dendriticum* (fam. *Dicrocoelidae*, distomate mici, cu testiculele anterioare ovarelor, metacercari dezvoltaţi în insecte), *Opisthorchis felineus*, *Clonorchis sinensis* (fam. *Opisthorchidae*, distomate mici, subţiri, metacercari închistaţi în carne de peşte), *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *S. haematobium* (fam. *Schistosomidae*, sexele sînt separate, oul neoperculat), *Paragonimus ringeri* (fam. *Troglotremidae*, corpul gros, metacercari închistaţi în crabi) şi altele.

Cestodele sînt viermi paraziţi, hermafrodiţi, fără tub digestiv. Epiteliul ciliat apare uneori la embrionul ieşit din ou. Prezintă pe scolex organe de fixare şi uneori cîrlige, iar corpul este alcătuit dintr-un lanţ de proglote, fiecare cu organizaţie reproducătoare proprie.

Cestodele se împart în două ordine : *Cyclophyllidae* şi *Pseudophyllidae.*

Ciclofilidele au patru ventuze, orificiile genitale aşezate lateral, ulterul închis şi oul cu embrion matur la eliminarea din organismul gazdei.

Ciclofilidele se împart în mai multe familii.

Familia *Taeniidae* se caracterizează prin alternarea papilei genitale pe laturi de la un proglot la altul, prin uterul închis, de forma unui canal longitudinal cu ramuri laterale şi prin ouăle cu coajă groasă. Dintre *Taeniidae*, parazitologia umană se ocupă de următoarele specii : *Taenia solium*, *T. saginata*, *Multiceps multiceps*, *M. serialis*, *Echinococcus granulosus* şi *E. sibiricensis*.

Familia *Hymenolepidae* se caracterizează prin poziţia papilei genitale numai pe o latură a corpului la toate segmentele, prin uterul sacciform şi prin ouăle cu coajă membranoasă. Din această familie fac parte *Hymenolepis nana* şi *H. diminuta*.

Familia *Dilepinidae* se caracterizează prin dubla organizare genitală hermafrodită cu papile genitale pe ambele laturi ale fiecărui segment, prin uterul împărţit în capsule ovifere şi prin aglomerarea ouălor mai multe într-o membrană. Din această familie face parte *Dipylidium caninum*.

Pseudofilidele au două botridii laterale, pe scolex pentru fixare, orificiile genitale situate median, uterul deschis la exterior printr-un tocostom şi oul operculat şi imatur la depunere. O singură familie interesează parazitologia umană.

Familia *Dyphilobotriidae* se caracterizează prin poziţia dorsală şi respectiv ventrală a botridiilor, iar oul maturat în apă eliberează un embrion ciliat, care ingerat de un crustaceu va evolua în primul stadiu larvar procercoid. Din această familie fac parte *Dyphillobotrium latum*, *Braunia jassiensis*, *Diplogonoporus brauni* ş.a.

FASCIOLOZA

Fasciola hepatica

Fascioloza este o boală frecventă la animalele cornute. La om boala apare rar şi prezintă în general un tablou clinic complex, cu semne grave şi evoluţie cronică cu complicaţii hepatice.

Morfologia parazitului. Este un trematod mare de 2—3 cm, foliaceu, prezentînd anterior o ventuză orală, iar în treimea anterioară a corpului o ventuză ventrală (fig. 407).

Tubul digestiv începe cu orificiul bucal din mijlocul ventuzei anterioare, se continuă cu un infundibul, un faringe puternic, esofagul şi în fine două cecuri intestinale cu o direcţie antero-posterioară, cu numeroase ramificaţii laterale înfundate.

Aparatul excretor este compus din canalicule excretoare în reţea ce se unesc într-un duct median care se deschide posterior.

Sistemul nervos este compus dintr-un inel ganglionar periesofagian şi din cordoane nervoase.

Aparatul reproducător mascul este alcătuit din doi testiculi ramificaţi, două canale deferente longitudinale, o veziculă seminală anterioară ventuzei ventrale, un canal ejaculator şi un organ de copulaţie numit cir, ultimele trei formaţiuni fiind cuprinse în punga cirului.

Aparatul reproducător femel este situat anterior. Glanda germigenă îşi varsă conţinutul în germiducte. În părţile laterale ale corpului se află glandele viteline care îşi varsă conţinutul în două canale longitudinale unite cu două canale transversale care merg spre un rezervor vitelin median. De aici porneşte canalul vitelin unic, care se uneşte cu germiductul principal în răspîntia genitală, denumită astfel, deoarece tot de aici porneşte uterul şi se găseşte glanda cojii.

Uterul, de culoare mai închisă, are un traiect răsucit şi se deschide în orificiul genital femel, situat alături de orificiul genital mascul. Tot din răspîntia genitală porneşte canalul Laurer, scurt şi deschis dorsal.

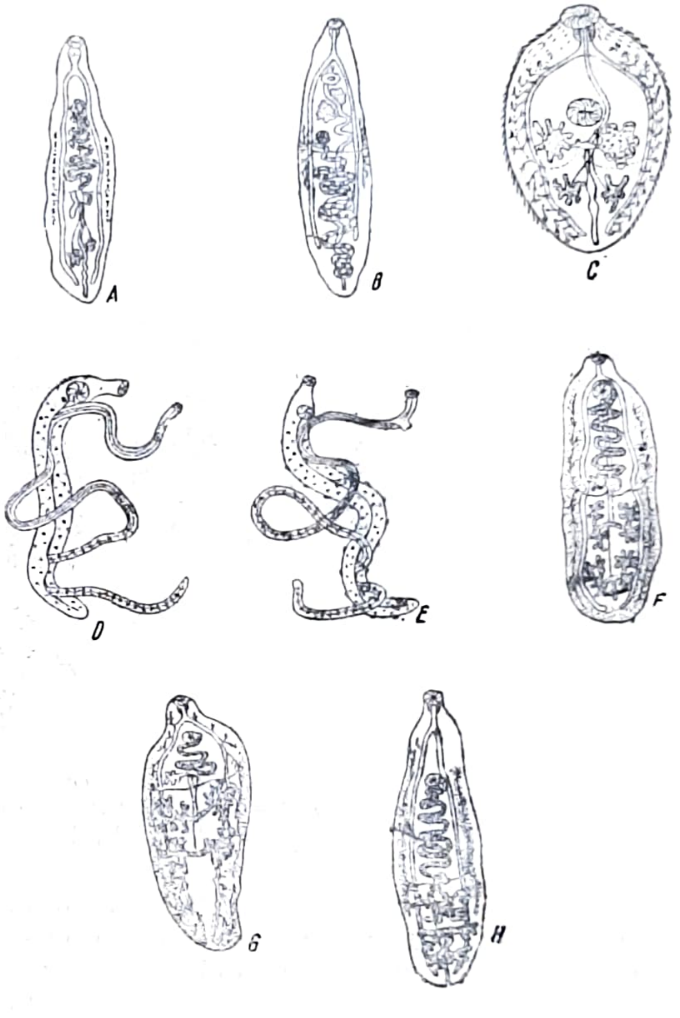


Fig 407. — Trematodele omului.

A — *Opistorchis felineus* (× 3); **B** — *Dicrocoelium dendriticum* (× 3); **C** — *Paragonimus ringeri* (× 3); **D** — *Schistosoma haematobium* (× 3); **E** — *Schistosoma mansoni* (× 3); **F** — *Fasciolopsis buski* (× 1); **G** — *Fasciola hepatica* (× 1); **H** — *Clonorchis sinensis* (× 2); (din Belding, 1052).

Oul de F. hepatica este mare (fig. 408); are 140 μ lungime şi 80 μ lăţime, forma ovalară, culoarea galbenă-brună. Coaja lui este subţire şi prezintă un căpăcel mic la unul din poli. Ouăle nu sînt embrionate în momentul depunerii, în interiorul lor găsindu-se o masă vitelină care înconjură celula ou. Uneori ouăle se văd deformate.

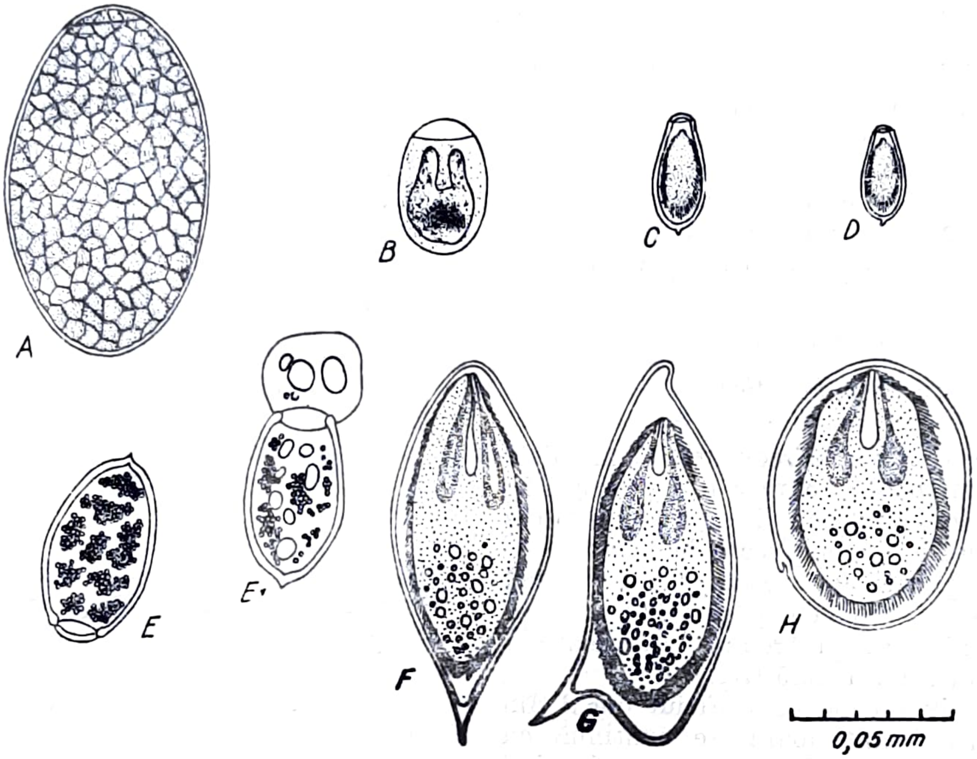


Fig. 408. — Ouă de trematode ale omului.

A — Fasciola hepatica; B — Dicrocoelium dendriticum; C — Clonorchis sinensis; D — Opisthorchis felineus; E şi *E₁ — Paragonimus ringeri; F — Schistosoma haematobium; G — Schistosoma mansoni; H — Schistosoma japonicum* (*C, D, F, G H,* — din Hackertt, Buckley şi Murgatroyd, 1954; *E* — din Smirnov, 1953).

Ciclul biologic (fig. 409). Ouăle sînt eliminate din căile biliare în intestin şi de aici o dată cu scaunul părăsesc organismul gazdă. Evoluţia are loc în mediul extern. Ouăle se embrionează la o temperatură peste 10—15°. În ou se formează o larvă ciliată numită *miracidium*, care iese din ou îndepărtînd căpăcelul oului. Miracidul este alungit, înconjurat de cili şi prezintă anterior un *rostru* şi o pată oculară. Miracidiul pătrunde în gazda intermediară care este un melc de apă din genul *Lymnaea*. În peretele camerei pulmonare, miracidiul evoluează şi se transformă într-o formaţiune ovalară, neregulată, numită *sporocist*. În sporocist se vor dezvolta ulterior *rediile* care reprezintă al doilea stadiu larvar. Rediile sînt alungite, au tubul digestiv abia schiţat şi un orificiu lateral. Rediile pornesc activ din sporocist, se îndepărtează de sacul respirator şi se îndreaptă spre hepatopancreas. Aici în interiorul rediilor vor lua naştere, vara, o altă generaţie de redii, sau toamna, al treilea stadiu larvar, *cercarul*. Cercarul este format dintr-o porţiune rotundă anterioară şi o porţiune alungită posterioară. El prezintă o ventuză bucală, un tub digestiv şi o ventuză ventrală. Cercarii părăsesc activ gazda, înoată liberi în apă şi cad la fund sau se fixează de vegetaţia din apă, închistîndu-se. Cercarul închistat este ovalar, învelit de o membrană groasă. Evoluţia parazitului de la eliminarea oului pînă la forma infestantă, cercarul, durează 2—3 luni. Introduşi în tubul digestiv al gazdei definitive, din cercarul închistat se eliberează parazitul şi migrează spre căile biliare, fie ascendent prin canalul coledoc, fie pe calea hematogenă prin vena portă, fie traversînd peritoneul şi capsula hepatică. În ficat, fasciola se dezvoltă şi ajunsă la maturitate va elimina ouă, care trec în intestin, se elimină din corp şi ciclul evolutiv continuă.

Rol patogen. *Fasciola hepatica* se localizează obişnuit în canalele biliare, rareori avînd localizări anormale în ţesutul subcutanat sau muscular. Ingerarea de ficat crud de vită parazitat duce la fixarea fasciolei în faringe, boală numită *halzum*. Fascioloza este o boală gravă. Perioada de invazie se caracterizează prin febră neregulată și stare generală alterată, cu o durată destul de lungă. În perioada de stare apar semne locale de obstrucție și inflamație a căilor biliare; tulburările digestive predomină. În această perioadă începe eliminarea de ouă, care pot să fie identificate în scaun. Evoluția bolii este în general lungă, mergînd uneori spre ciroză hepatică.

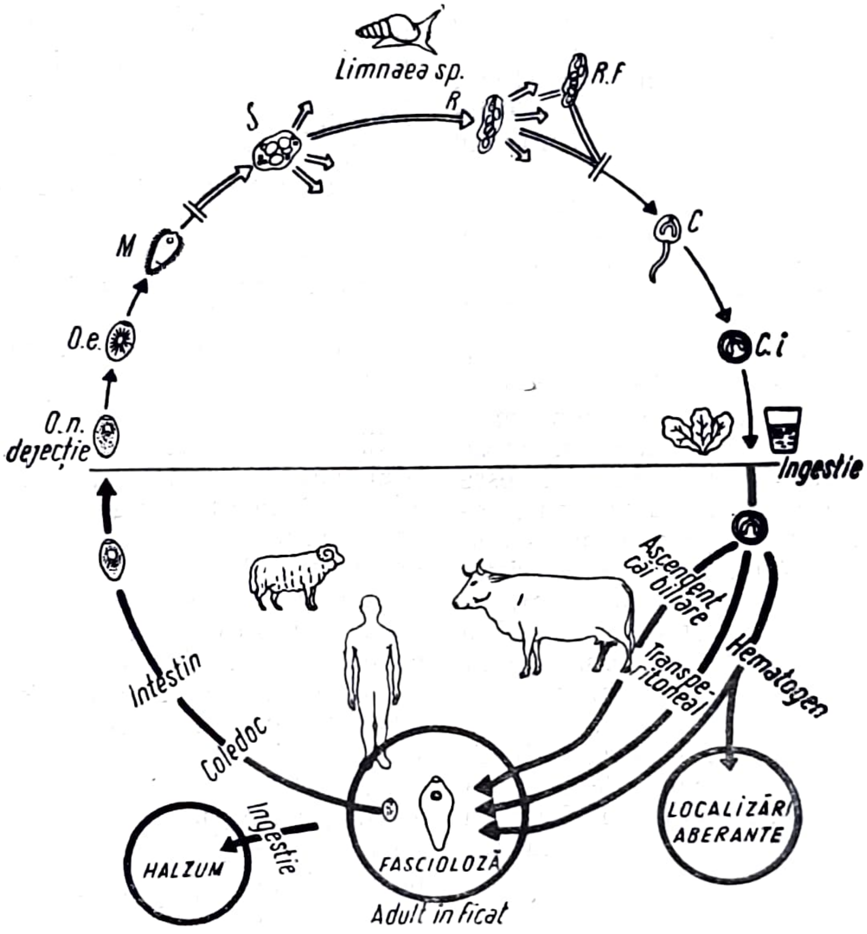


Fig. 409. — Fasciola hepatica, ciclul biologic.

On — ou neembrionat; *Oe* — ou embrionat; *M* — miracidium; *S* — sporochist; *R* — redie; *Rf* — redie fiică; *C* — cercar; *Ci* — cercar închistat → evoluția în gazda definitivă → evoluția în mediul fizic extern ⇄ evoluția în gazda intermediară.

Epidemiologie. Fascioloza este o zoonoză; boala este specifică cornutelor domestice, omul intrînd numai accidental în ciclul biologic al parazitului. În calea de transmitere a bolii, locul principal îl joacă melcii de apă cu rol de gazdă intermediară. De fapt, răspîndirea fasciolozei este determinată de aria de răspîndire mare a acestor specii de moluște.

Omul se infestează consumînd apă cu cercari închistați sau salate sălbatice care cresc pe malul mlaștinilor. În țara noastră, infestările la animale domestice se ridică pînă la 50% pentru unele regiuni (Lupașcu, Ungureanu, Nițulescu și colaboratorii, 1960). Cazurile de fascioloză umană sînt însă rare. În ultimii 30 de ani, în țara noastră au fost descrise 7 cazuri. Boala este desigur mai frecventă. Faptul că din cele 7 cazuri descrise la noi, 5 sînt recente (din ultimii 4 ani), dovedește o atenție crescută și o îmbunătățire netă a metodelor de diagnostic.

Diagnosticul de laborator de certitudine îl dă punerea în evidență a ouălor de paraziți. Materialul examinat este scaunul și lichidul obținut prin tubaj duodenal, în special bila B.

Este indicat un colagog, administrat bolnavului în prealabil.

Examenul direct al fecalelor între lamă și lamelă pune în evidență oul de fasciola. Este mare, prezintă un mic opercul și are forma ovalară, puțin ascuțită la capete. Erori de diagnostic pot avea loc cînd bolnavul a consumat ficat parazitat, din care ouăle ajung în scaun; sînt așa-numite ouă de „trecere'' prin tubul digestiv. O dietă alimentară fără ficat de 4—5 zile sau examenul bilei rezolvă diagnosticul.

Examenul prin *metoda de concentrare* Telemann este indicat mai ales pentru controlul după tratament.

Din *bilă* se examinează microscopic, între lamă și lamelă, sedimentul obținut prin centrifugare.

Reacția de fixare a complementului este utilă mai ales în prima fază a bolii, cînd ouăle încă nu au apărut în scaun.

Tabloul sanguin. Uneori bolnavii prezintă o leucocitoză foarte marcată, alteori numărul leucocitelor în milimetrul cub de sînge este normal. Eozinofilia este foarte precoce. Eozinofilele cresc procentual în prima fază a bolii, ajungînd peste 70 și chiar peste 80% după 3—4 luni de la infestarea cu cercari. În jurul acestui termen apar și ouă în scaun. În fața unui tablou clinic caracteristic și a unei eozinofilii ridicate, instituirea tratamentului antiparazitar nu trebuie să aștepte apariția ouălor în scaun. În faza a doua a bolii, numărul eozinofilelor scade, apropiindu-se de normal mai ales la bolnavii cronici.

Anemia începe chiar în prima fază a bolii, într-o formă ușoară. În perioada de stare a bolii, anemia progresează, numărul de hematii diminuînd către 2 000 000 mm³, rareori în jur sau chiar sub 1 000 000.

FASCIOLOPSIS BUSKI

F. buski este cel mai mare dintre trematodele parazite ale omului. Măsoară 3 cm lungime 1—1,2 cm lățime și 0,2—0,3 cm grosime. Oul este ovalar, de 135 μ lungime și 80—85 μ grosime. Coaja oului este subțire. Oul prezintă un opercul și nu este embrionat la emisiune.

Evoluția parazitului este asemănătoare cu cea a *F. hepatica*. Gazda intermediară este o moluscă. Cercarii se închistează pe plantele de apă. Aceste plante consumate crude aduc o dată cu ele în organism cercarii închistați infestanți.

F. buski se localizează în duoden. Clinic, boala datorită acestui trematod se manifestă prin febră și diaree sanguinolentă. Formele clinice ale bolii sînt determinate în primul rînd de numărul de paraziți care se găsesc în duoden. *F. buski* este răspîndit la om în Asia de răsărit și de sud: Japonia, China, India.

Între trematodele parazite în intestin, pe lîngă *F. buski* se mai pot identifica specii din genurile *Metagonimus*, *Heterophyes* și altele.

DICROCELIOZA

Dicrocoelium dendriticum

D. dendriticum este un parazit frecvent al cornutelor. La om, boala apare rar și se manifestă printr-o simptomatologie și o evoluție mai ușoară decît fascioloza.

Morfologia parazitului. *D. dendriticum* este un trematod mic de 1—2 cm, lanceolat. Aparatul genital mascul, situat anterior față de cel femel, este format din doi testiculi lobați. Glandele viteline, mai puțin dezvoltate decît la *F. hepatica*, ocupă numai treimea mijlocie a părților laterale ale viermelui. Cecurile intestinale sînt simple, neramificate și scurte.

Oul este mic, ovalar, ușor asimetric, plan-convex. Are 40 μ lungime și 20—30 μ lățime. Culoarea oului este brună, uneori destul de închis sau brună-auriu. Oul are un înveliș extern gros. La un pol prezintă un opercul mare, distinct. În interiorul oului se observă embrionul.

Ciclul evolutiv. Oul de *D. dendriticum* este rezistent la desicație, dar embrionul nu se liberează în apă. Ingerat de un melc de uscat din genul *Zebrina*, *Helicella* sau *Theba*, din embrion se dezvoltă două generații de sporociști în hepatopancreasul moluscului. În sporocist apar cercari ovalari avînd un mic stilet oral și o coadă lungă. Pe timp de secetă, cercarii nu părăsesc gazda intermediară, ci numai pe timp ploios, fiind eliminați de melc în jur, aglomerați sub forma unor bule vîscoase.

Cercarii de *D. dendriticum* se numesc *Cercaria vitrina*. Evoluția parazitului necesită o a doua gazdă intermediară, care este o furnică de iarbă, *Formica fusca*, care ingerează bulele vîscoase cu cercari eliminate de prima gazdă intermediară. În furnică se formează metacercari închistați. Vertebratele se infestează ingerînd o dată cu iarba furnici cu metacercari. Metacercarul se dechistează în intestin, ajunge prin canalul coledoc sau pe cale hematogenă în căile biliare superioare, unde se formează adultul.

Rol patogen. *D. dendriticum* se localizează în canalele biliare. Rolul lui patogen este asemănător cu al *F. hepatica*, boala manifestîndu-se prin fenomene clinice mai atenuate, iar prognosticul fiind mai favorabil.

Epidemiologie. Dicrocelioza este o zoonoză. Boala este specifică ovinelor și bovinelor. Este mai rară la om decît fascioloza. Omul se infestează accidental, ingerînd furnici purtătoare de metacercari.

Diagnosticul de laborator este acelaşi ca şi pentru fascioloză. Oul de *D. dendriticum* se identifică graţie formei ovalare asimetrice, dimensiunilor, cojii groase, culorii închise. Erori de diagnostic pot să aibă loc cu ouă de *D. dendriticum* în trecere prin tubul digestiv, ouă ingerate o dată cu ficatul de vită cu paraziţi. Un regim de cîteva zile, fără ficat în alimentaţie, rezolvă diagnosticul.

OPISTORCHOZA

Opisthorchis felineus

Opistorchoza este o boală datorită trematodului *O. felineus*, parazit specific pisicii şi cîinelui. Boala se întîlneşte rar la om, este asemănătoare fasciolozei, dar de gravitate mai mică.

Morfologia parazitului. *O. felineus* este un trematod mic, sub 2 cm, lanceolat, albicios. Aparatul reproducător mascul este posterior faţă de cel femel, glandele viteline sînt mici, situate în treimea mijlocie a părţilor laterale ale parazitului. Cecurile intestinale sînt simple, neramificate şi mai lungi decît la *D. dendriticum*.

Oul este mic, de 25—30 μ, ovalar, brun şi prezintă la un capăt un opercul mare, iar la capătul opus o formaţiune exterioară, ca un mic pinten. Coaja oului este groasă. În interior se găseşte un miracidiu complet format în momentul eliminării oului din organismul gazdei prin scaun.

Ciclul evolutiv. Ouăle şi miracidiul de *O. felineus* pot să fie înghiţite în apă de un melc din genul *Bithynia*, care reprezintă prima gazdă intermediară. Din embrion, în melc evoluează un sporocist în regiunea terminală a intestinului. Din sporocist se formează redii care vor evolua în hepatopancreasul moluscului. Din redii se formează cercarii, care se dezvoltă pînă ajung la un aspect, caracteristic, cu două pete oculare, un apendice caudal bine dezvoltat, avînd două aripioare laterale. Cercarii părăsesc melcul, înoată liberi în apă şi pătrund activ în a doua gazdă intermediară, care este reprezentată de mai multe specii de peşti. Cercarii se închistează în ţesutul subcutanat sau în muşchii peştelui, devenind metacercari. Gazda definitivă se infestează ingerînd carne de peşte cu metacercari.

Rol patogen. Parazitul se localizează în căile biliare în mod obişnuit şi numai rareori invadează pancreasul. Boala este asemănătoare fasciolozei sau dicroceliozei, gravitatea şi evoluţia fiind în funcţie de numărul de paraziţi.

Epidemiologie. Opistorchoza este o zoonoză. Viermele adult parazitează cîinele şi pisica. Parazitul este însă bine adaptat la organismul uman.

Evoluţia parazitului, caracteristicile închistării cercarilor, precum şi speciile de peşti reprezentînd a doua gazdă au fost cercetate pe larg în ţara noastră de Ciurea. Speciile de peşti gazde sînt numeroase : linul, crapul, văduviţa, plătica şi altele. Boala a fost descrisă şi la om, în ţara noastră (Ungureanu, 1948).

Diagnosticul de laborator este acelaşi ca cel al fasciolozei şi dicroceliozei. Posibilitatea erorilor de diagnostic datorite ouălor de trecere se exclude.

CLONORCHOZA

Clonorchis sinensis

Clonorchoza este infestaţia cu *C. sinensis*; specifică animalelor domestice cîine, pisică, porc, boala apare şi la om, mai ales în anumite ţări. Formele cronice pot să ducă la scleroze hepatice. *C. sinensis* este un trematod mic, de 1—2 cm, alungit, foliaceu, roşcat. Testiculii sînt ramificaţi, situaţi posterior aparatului reproducător femel. *Oul* este asemănător oului de *O. felineus*, dar este colorat foarte închis, aproape negru. Miracidiul este dezvoltat în ou la emisiune. Stadiile de dezvoltare au loc într-un melc din genul Bithynia. Cercarii liberaţi în apă se închistează în carnea unor specii de peşti. Parazitul determină o afecţiune asemănătoare cu cea dată de *O. felineus*, localizîndu-se în căile biliare şi mai rar în pancreas. Adultul are drept gazde definitive cîinele, pisica, porcul. Parazitul este bine adaptat şi la om. Diagnosticul de laborator este acelaşi cu cel al fasciolozei şi dicroceliozei.

PARAGONIMOZA

Paragonimus ringeri

Morfologia parazitului. Parazitul este mic, de 1—1,5 cm foarte gros, de forma unei boabe de cafea, plan-convex, roşcat-închis. Testiculii lobaţi sînt aşezaţi posterior aparatului reproducător femel. Glandele viteline sînt mari, situate pe toată lungimea părţilor laterale. *Oul* este ovalar, mare, de 85—100μ lungime şi 50—65 μ lăţime, operculat, brun-roşcat, neembrionat, cu o coajă groasă.

Ciclul evolutiv. Embrionarea are loc în mediul extern într-un interval de timp destul de lung. Miracidiul liberat în apă pătrunde într-un melc din genul *Melania*, unde se dezvoltă sporocistul, două generaţii de redii şi cercarii care trec în apă. Cercarii sînt caracteristici, au un stilet anterior şi un apendice caudal scurt. Cercarii pătrund în a doua gazdă intermediară, un crustaceu din genul *Potamon*, şi se închistează, transformîndu-se în metacercari. Aceştia devin infestanţi pentru gazda definitivă vertebrată după cîteva săptămîni. Crustaceii cu metacercari, ingeraţi de gazda definitivă, liberează parazitul în intestin. Traversînd peritoneul, diafragmul şi pleura, paraziţii se localizează cîte doi, faţă în faţă, în bronhiolele mici. Ouăle eliminate prin spută vor continua în mediul extern ciclul biologic.

Rol patogen. Parazitul localizat în plămîni provoacă tulburări locale şi generale. Uneori parazitul prezintă localizări aberante în afară de plămîn, în alte organe. Boala prezintă deseori complicaţii datorite ouălor care ajung în circulaţia pulmonară şi determină embolii în diferite organe.

Epidemiologie. Paragonimoza este o boală exotică pentru Europa. Delimitarea ariei de răspîndire a paragonimozei este determinată de răspîndirea gazdelor intermediare. Boala este o zoonoză, parazitul adult găsindu-se la mai multe specii de animale.

Diagnostic de laborator. Ouăle de parazit se găsesc în număr mare în expectorație. Un examen al sputei pune în evidență, pe lîngă ouă de paraziți, cristale Charcot-Leyden. Rareori, cu expectorația sînt aruncați și paraziți adulți. Ouăle de *P. ringeri* pot să fie identificate, de asemenea într-un examen coprologic, ca urmare a înghițirii expectorației.

SCHISTOSOMOZA

Schistosoma haematobium

S. haematobium este agentul etiologic al schistosomozei genito-urinare. Boala este răspîndită în Africa de nord. Parazitul, spre deosebire de celelalte trematode, are sexele separate. Masculul are 1—1,5 cm lungime. Corpul lui este ca un șanț. Femela este cilindrică, are 2 cm lungime și este adăpostită în șanțul masculului. Oul are forma ovală, 120—190 μ lungime și 50—73 μ grosime. Culoarea oului este gălbuie. Oul este ușor transparent, nu are opercul și prezintă un spin situat la unul dintre poli. În interior adăpostește un embrion ciliat. Evoluția parazitului este asemănătoare cu cea a fasciolei. Cercarii au coada bifidă și pătrund activ prin pielea gazdei definitive.

La om, parazitul trăiește în vene, mai ales în plexul uterin, veziculo-prostatic și pubian, provocînd obstrucții și inflamații. Boala se manifestă în special prin hematurie. Ouăle se elimină prin urină, cu dureri arzătoare datorite iritației determinate de spinul ascuțit al oului și inflamației tractului urinar. Uneori ouăle se elimină cu fecalele.

Diagnosticul se bazează pe decelarea ouălor în sedimentul urinar sau în scaun prin examen direct sau prin metoda de concentrare cu centrifugări succesive. Reacțiile imunobiologice au specificitate. Eozinofilia este foarte mare în prima fază a bolii, ajungînd la cele mai ridicate cifre prin luna a 4-a de la infestare (peste 80%), scăzînd lent ulterior. Timp de mai mulți ani, eozinofilele rămîn la valori de 5—6%.

Schistosoma mansoni

Parazitul provoacă boala denumită *bilharzioza intestinală*. Adultul seamănă cu *S. haematobium* și trăiește în venele rectale și în vena portă, provoacă leziuni intestinale frecvente și un tablou clinic caracterizat prin faze acute diareice și complicații tardive hepatice (ciroză) și splenice. Boala este răspîndită în Africa și America centrală.

Ouăle parazitului se întîlnesc în scaun, au 112—162 μ lungime și 60—70 μ grosime. Sînt colorate gălbui și au un spin ascuțit îndreptat în afară, situat lateral între treimea mijlocie și ultimă. Oul prezintă un embrion ciliat.

Zotta și colaboratorii (1942) au diagnosticat în țara noastră un caz de schistosomiază intestinală cu infestare exotică.

Schistosoma japonicum

Parazitul este agentul etiologic al schistosomozei arteriovenoase orientale, boală manifestată prin febră, un sindrom intestinal cu dizenterie cronică, hepatomegalie, splenomegalie și un sindrom sanguin cu anemie. Boala este răspîndită în Extremul orient.

Parazitul adult seamănă cu *S. haematobium*, dar este mai mic. Se localizează în vene, în special în vena portă. Ouăle au 83 μ lungime și 62 μ grosime și prezintă un embrion ciliat. Diagnosticul se bazează pe identificarea ouălor în scaun.

TENIOZA ȘI CISTICERCOZA

Taenia saginata, Taenia solium

Tenioza este boala datorită prezenței în intestinul omului a paraziților *T. saginata* și *T. solium*. Boala are manifestări clinice nespecifice, diagnosticul bazîndu-se numai pe identificarea ouălor sau fragmentelor de tenii eliminate din organism. Boala este larg răspîndită și se transmite prin consumul de carne cu cisticerci (larve ale acestor tenii).

Cisticercoza omului este o boală gravă datorită prezenței în organism a cisticercilor sau larvelor de tenii. Cisticercoza apare ca urmare a pătrunderii ouălor (embrioforilor) de tenii în stomac.

Morfologia parazitului (fig. 410). *T. saginata* este un cestod lung de 6—10 m, de culoare albicioasă și opacă. Anterior, corpul este subțire, aproape filiform, iar posterior devine din ce în ce mai lat, ajungînd la 1 cm. Corpul este alcătuit din scolex, gît și strobilă sau lanțul de segmente. *Scolexul* sau capul are 1,5—2 mm, este alungit, are patru ventuze ovale, iar central o depresiune pigmentată. Nu are cîrlige. Gîtul are 2—4 cm, este uniform, neîmpărțit în segmente și leagă scolexul de primele segmente. *Strobila* este lanțul de segmente sau proglote în număr de 1 500—2 000. Proglotele se formează în regiunea gîtului, cresc mereu și pe aceeași măsură se depărtează de gît, pînă ajung la capătul posterior și se elimină. Ca vîrstă, deci în funcție de poziția pe care o au în strobilă, proglotele pot să fie tinere, adulte și bătrîne. Proglotele tinere sînt mai mult late decît lungi și au organele reproducătoare încă nedezvoltate. Proglotele adulte sînt dreptunghiulare sau pătrate și au organele reproducătoare dezvoltate complet. Proglotele bătrîne sînt lungi, au organele reproducătoare atrofiate, rămînînd numai uterul ca un sac plin cu ouă.

În organizarea internă a unui *proglot adult* se observă organe comune întregului lanț (sistemul nervos și aparatul excretor) și organe proprii fiecărui proglot (aparatul reproducător femel și mascul). *Sistemul nervos* este format dintr-un inel ganglionar situat în scolex. Din acest centru nervos pornesc cordoane nervoase descendente, în tot lungul strobilei. *Aparatul* *excretor*, alcătuit din canale longitudinale laterale, unite în fiecare proglot printr-un canal transversal, are un aspect scalariform. Canalele longitudinale comunică cu exteriorul la nivelul ultimului proglot. *Aparatul reproducător mascul* este format din numeroşi foliculi testiculari, canale aferente care se unesc într-o veziculă seminală şi un canal deferent care se îndreaptă spre papila genitală. În porţiunea terminală, canalul deferent intră în punga cirului şi se transformă în cir sau organul funcţional de copulaţie. *Aparatul reproducător femel* este reprezentat prin două glande germigene de la care pornesc canale care converg către un germiduct comun. Glanda vitelină, situată în partea inferioară a proglotului, este unită prin viteloduct de germiductul comun, într-un punct numit răspîntia genitală. În acelaşi loc se deschid vaginul şi uterul şi se găseşte glanda cojii. Vaginul porneşte din papila genitală, unde prezintă un sfincter muscular, se îndreaptă median, formînd un receptacul seminal, şi se uneşte, în sfîrşit, cu germiductul. Uterul are o direcţie longitudinală, pornind din răspîntia genitală şi îndreptîndu-se anterior. Papila genitală se poate uşor observa ca o proeminenţă pe una din laturile proglotului.

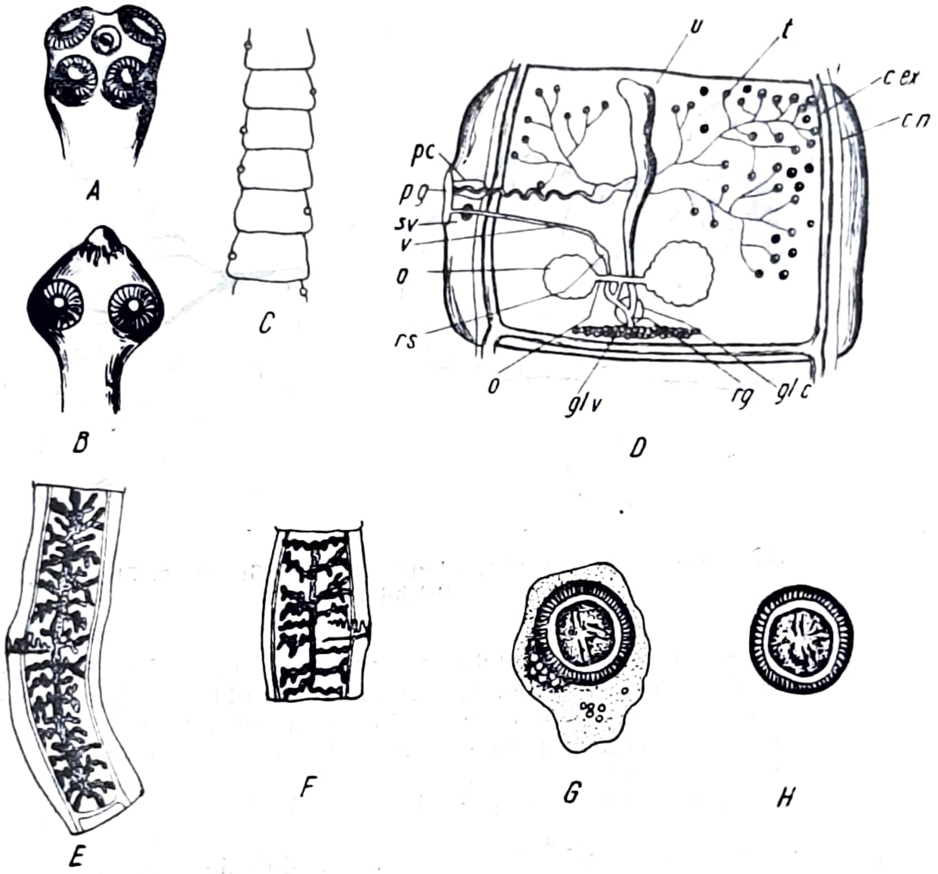


Fig. 410. — Taenia solium şi Taenia saginata.

A — scolex de *T. saginata*; *B* — scolex de *T. solium*; *C* — lanţ de proglote; *D* — proglot adult de *T. saginata*; *E* — proglot bătrîn de *T. saginata*; *F* — proglot bătrîn de *T. solium*; *G* — ou de tenie; *H* — embriofor; *pg* — por genital; *pc* — punga cirului; *sv* — sfincter vaginal; *v* — vagin; *rs* — receptacul seminal; *gl g* — glandă germigenă; *o* — oviduct; *gl v* — glandă vitelină; *rg* — răspîntie genitală; *gl c* — glanda cojii.

Proglotul bătrîn este dreptunghiular, alungit, are 2—3 cm lungime şi culoare albicioasă. Uterul este mult dezvoltat, prezentînd aproximativ 20 de ramificaţii de fiecare parte, ramificaţii care se subdivid la rîndul lor dihotomic. Ramificaţiile uterine sînt pline cu ouă. La proglotul bătrîn se observă de asemenea papila genitală și ductele care converg spre aceasta. Restul aparatului reproducător mascul și femel a dispărut.

Oul este rotund ovalar, cu contur neregulat. El este alcătuit dintr-o masă vitelină și un embriofor central. Masa vitelină se pierde curînd, astfel încît embrioforul reprezintă elementul de bază pentru diagnosticul microscopic al teniazei. *Embrioforul* este rotund-ovalar, are 35—50 μ diametrul mare și 20—30 μ diametrul mic. Are o coajă groasă, striată, caracteristică. În interior se remarcă un embrion cu 6 cîrlige; este *embrionul hexacant*.

Cisticercul este larva de tenie dezvoltată din embrion în mușchii gazdei intermediare. Forma cisticercului este ovalară, cu dimensiunea sub 1 cm, albicios (fig. 411). Cisticercul este format dint-ro veziculă cu lichid, în interiorul căreia se observă o adîncitură a membranei cisticercului ,iar în fundul adîncituriі, către exterior, există scolexul viitoarei tenii.

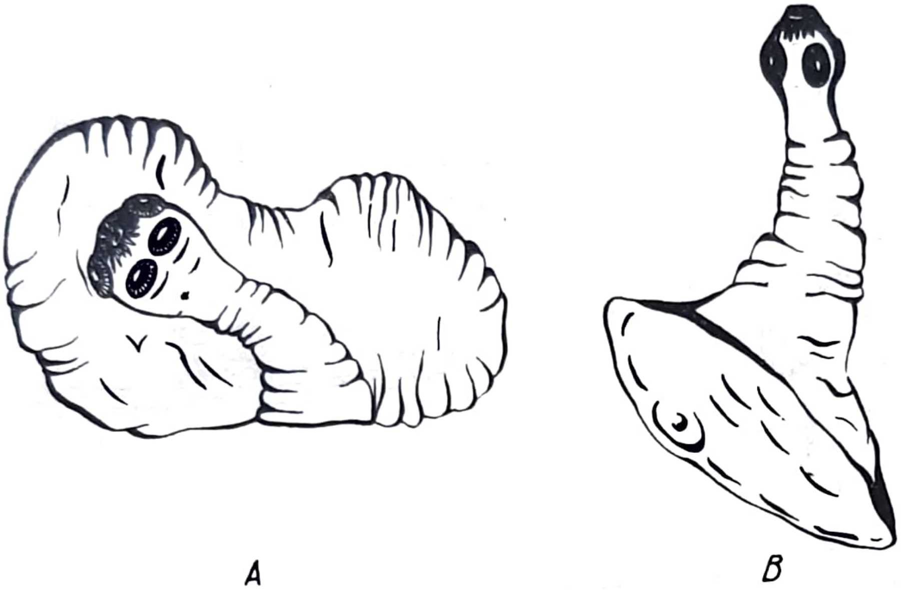


Fig. 411. — Cisticerc invaginat (*A*) și dezinvaginat (*B*) (Georgescu, Steinbach, Simionescu, Belchiță, 1955).

Taenia solium este asemănătoare cu *Taenia saginata* ca aspect general și organizare internă. Menționăm cîteva din deosebirile importante privind morfologia celor două tenii.

Taenia solium este mai scurtă, are 3—5 m, iar musculatura ei este mai slab dezvoltată. Scolexul este mai mic, de 1 mm diametru și prezintă un rostru apical cu două coroane de cîrlige pentru fixare. Fiecare cîrlig este format dintr-o lamă, un mîner și o gardă intercalară. Papila genitală alternează mai regulat de la un proglot la altul. *T. solium* nu prezintă sfincter vaginal, iar ductul vaginal este mai sinuos. Proglotul bătrîn este dreptunghiular, dar mai puțin alungit decît la prima tenie. Uterul prezintă 8—10 ramificații laterale care se subdivid la rîndul lor dendritic. Embrioforul de *T. solium* este rotund, cu 30—40μ diametru. Coaja embrioforului este brună și mai groasă. Cisticercul *T. solium* este mai mare, depășind 1 cm în dimensiuni, iar scolexul lui prezintă coroanele caracteristice de cîrlige.

Ciclul biologic (fig. 412). Proglotele bătrîne de *T. saginata* pline cu ouă se rup de restul strobilei și se elimină pe rînd. În drum spre partea terminală a intestinului omului, proglotele bătrîne pot să piardă o parte din ouă. Aceste ouă pot să fie decelate cu ocazia unui examen coprologic. Avînd musculatura bine dezvoltată, proglotele se mișcă în masa fecalelor și pot să se deplaseze, lăsînd în urmă o dîră de ouă. Datorită acestor mișcări caracteristice, proglotele bătrîne de *T. saginata* pot să fie identificate la un examen macroscopic.

Embrioforii de tenie ajunși pe sol se împrăștie. Ei pot să fie ingerați de bovine o dată cu iarba. În intestinul bovinelor embrionii sînt puși în libertate, pătrund prin peretele intestinal, trec în circulația generală și se opresc în mușchi, unde se transformă în larve veziculate, *cisticerci*. Cisticercul de *T. saginata* se numește *Cisticercus bovis*. El este localizat cu precădere în mușchii masticatori sau în pericard. Din carnea infestată, ingerată de om, scolecșii vor fi puși în libertate în intestin, și se vor fixa de peretele intestinal. Tenia începe să crească și după aproximativ 3 luni se elimină primele proglote bătrîne cu ouă.

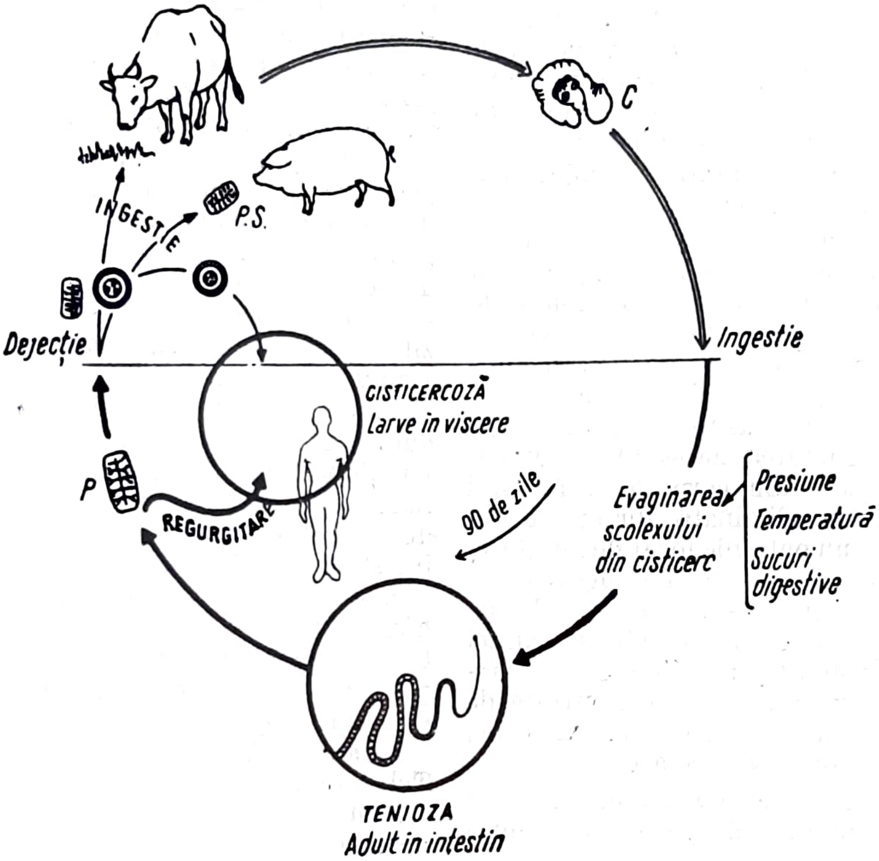


Fig. 412. — Taenia solium și *Taenia saginata*, ciclu biologic.

P – proglot cu ouă eliminat prin fecale; *Es* – embriofori de *T. saginata* diseminați pe iarbă; *Ps* – proglot de *T. solium* ingerat de porc; *C* – cisticerc în mușchii gazdei intermediare. → evoluția în gazda definitivă → trecerea prin mediul extern ⇄ evoluția în gazda intermediară.

Ciclul biologic al *T. solium* este asemănător. Gazda intermediară este porcul, în care se formează larva numită *Cisticercus cellulosae*. Mușchii cei mai infestați sînt mușchii gîtului și pieptului și mușchii limbii.

Rol patogen. Omul este gazda stadiului adult, atît al *T. solium*, cît și al *T. saginata*. Boala este cunoscută sub numele de *teniază*. Clinic boala se manifestă prin semne care privesc aparatul digestiv și semne generale, necaracteristice. Bolnavul se plînge de greață, vărsături, tulburări ale poftei de mîncare, diaree sau constipație, pierdere în greutate. Tulburări din partea sistemului nervos și o anemie moderată pot să însoțească semnele digestive. Uneori purtătorul de tenie nu prezintă nici un semn clinic important, boala trecînd neobservată pînă la sesizarea unor proglote în scaun.

Accidental, omul poate să găzduiască în organismul său cisticerci de tenii în special de *T. solium*. Omul poate să se infesteze cu embriofori consumînd alimente sau apă poluată. Boala poate să aibă însă și o cauză internă. Este vorba despre autoinfestarea endogenă de la o tenie adultă proprie, prin pătrunderea în stomac a proglotelor bătrîne sau a embrioforilor, ca urmare a mișcărilor antiperistaltice intestinale. Sub acțiunea sucurilor digestive, embrionii sînt puși în libertate și invadează organismul gazdei.

Cisticercoza apare deci, ca o complicație gravă a teniazei.

Cisticercii se localizează la om de predilecție în ochi sau în creier, afecțiunea fiind deosebit de gravă. O formă specială este *Cisticercus racemosus*, localizat în spațiile subarahnoidiene.

Epidemiologie. Sursa de infestație a teniazei este omul. Boala este o biohelmintoză, deoarece formele larvare se dezvoltă și se transmit prin gazde intermediare. Două momente prezintă importanță epidemiologică în ciclul biologic al parazitului : infestarea gazdelor intermediare cu embriofori din mediul extern și infestarea omului cu cisticerci din carne.

Marea răspîndire a teniazei pe tot globul se explică prin condițiile prielnice pe care parazitul le găsește oriunde pentru evoluția lui. Condițiile igienico-sanitare deficiente sau lipsa closetelor și obiceiul multora să defece direct pe pămînt la întîmplare duc la poluarea intensă a solului. Scriabin a atras atenția asupra pericolului pe care îl prezintă ignorarea necesității neutralizării parazitului scos din corp în urma unui tratament. O tenie eliminată direct pe sol poate să constituie un puternic focar de infestare, mai ales în cazul *T. solium.* Pe lîngă nerespectarea normelor igienico-sanitare de îndepărtare a dejectelor umane, la răspîndirea teniazei contribuie și rezistența embrioforilor la condițiile de mediu extern, fapte demonstrate de Podiapolskaia. Acești factori duc la infestarea frecventă a gazdelor intermediare.

Omul se îmbolnăvește consumînd carne cu cisticerci, fără o prealabilă prelucrare termică suficientă.

Incidența celor două tenii nu este egală; *T. saginata* este mai frecventă, deoarece infestarea bovinelor este în general mai discretă, iar cisticercii trec neobservați în carne. Porcul prezintă însă deseori o infestație cu cisticerci masivă, evidentă, ca urmare a obiceiului acestui animal să-și caute hrana în jurul casei omului și să scurme în toate necurățeniile, avînd astfel ocazia să ingereze proglote întregi. Carnea de porc infestată se recunoaște ușor prin dimensiunile mai mari și numărul cisticercilor, iar omul are posibilitatea să ia din timp măsurile necesare.

Incidența teniazei în țara noastră este inegală în diferite regiuni. Cu toate că media infestărilor este destul de mică există zone în care teniaza este mai frecventă. Lupașcu, Ungureanu, Nițulescu și colaboratorii (1960) au atras atenția asupra unor astfel de zone, ca Moldova centrală și de sud și partea sudică a Banatului.

Diagnostic de laborator. Diagnosticul de certitudine al teniazei se bazează pe identificarea proglotelor sau a embrioforilor în scaun.

Examenul macroscopic al proglotelor conduce la identificarea parazitului. *T. saginata* elimină fiecare proglotă separat. Proglotele pot să părăsească organismul omului între scaune, forțînd sfincterul anal. Proglotele bătrîne se recunosc prin forma lor dreptunghiulară alungită, culoarea albă-opacă, dimensiunile de aproximativ 3 cm lungime și 1—1,5 cm lățime, mișcările periodice cu deplasări active, întrerupte de intervale de repaus și desenul uterin. Proglotul poate să fie examinat cu lupa. De un interes deosebit este examinarea teniei eliminate după tratament, pentru ca să se constate dacă parazitul prezintă scolexul sau nu. Scolexul este vizibil cu ochiul liber sau cu lupa.

T. solium elimină proglotele în grupuri, o dată cu scaunul. Segmentele sînt mai mici, au 1,5 pe 1 cm. Proglotele de *T. solium* examinate în laborator reprezintă un material extrem de periculos. Embrioforii pot să fie cauza unor infestări de laborator.

Examenul microscopic al scaunului se face *direct* între lamă și lamelă. Embrioforul identificat se studiază în amănunt cu obiectivul 7 pentru ca să se vadă embrionul hexacant și structura cojii.

Ca *metodă de concentrare* se recomandă metoda Telemann.

Examenul hematologic în teniază prezintă deseori o eozinofilie mai mult sau mai puțin marcată. De fapt eozinofilia variază în cursul teniazei. Inițial, în perioada de dezvoltare a parazitului, eozinofilele pot să atingă procentul de 50% din globulele albe. Ulterior eozinofilele scad, rămînînd multă vreme la un procent în jurul lui 10—15.

Diagnosticul de laborator al cisticercozei se adresează examenului unor materiale recoltate prin biopsie subcutanată sau musculară. Cisticercii se studiază între două lame sub presiune, lamele fiind prinse între ele cu o clemă metalică sau un cerc elastic. Se observă scolexul cu cele 4 ventuze și la *T. solium* se văd în plus cele două coroane de cîrlige.

MULTICEPS MULTICEPS, MULTICEPS SERIALIS

Ambele tenii sînt parazite ale cîinelui. Lungimea viermelui adult este sub 1 m. Prezintă un scolex cu 4 ventuze și o dublă coroană de cîrlige. Formele larvare evoluează la animale și excepțional la om. Aceste forme larvare, numite *cenur*, se caracterizează printr-o veziculă mare, cu numeroși scolecși în interior. Cenurul de *M. multiceps* se numește *Cenurus cerebralis* și se localizează la suprafața creierului de oaie. Cenurul de *M. serialis* se numește *Cenurus serialis* și se localizează în țesutul subcutanat al iepurelui. Excepțional, aceste forme larvare au fost identificate la om.

HIDATIDOZA

Echinococcus granulosus

Hidatidoza este o boală datorită prezenței în organism a chistului hidatic. Chistul hidatic reprezintă forma larvară a unei tenii mici, parazite a cîinelui, tenie numită *E. granulosus.*

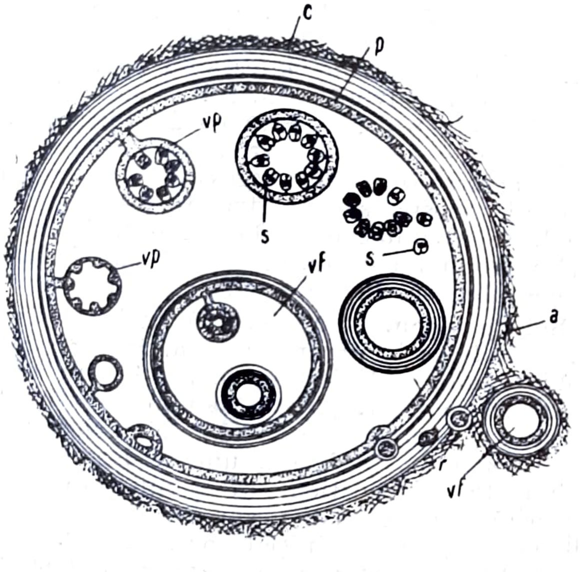


Fig. 413. — Chistul hidatic.
c — membrană cuticultură; *p* — membrană proligeră; *vp* — veziculă proligeră; *s* — scolex; *vf* — veziculă fiică; *a* — membrană adventice (Georgescu ș.a., 1955, din Gilbert).

Hidatidoza este o afecțiune foarte frecventă a cornutelor, întîlnită destul de des și la om.

Morfologia parazitului. *Tenia adultă* a cîinelui este foarte mică, avînd 3—6 mm. Scolexul prezintă patru ventuze și o dublă coroană de cîrlige. Strobila este alcătuită din 3—4 proglote ovalare. Ultimul segment este proglota bătrînă, al cărei uter conține cîteva sute de ouă.

Embriioforii sînt ovalari, cu dimensiunea 25—35 μ. Prezintă un înveliș gros striat și un embrion hexacant în interior.

Forma larvară, hidatida sau *chistul hidatic* (fig. 413) este rotund și conține mai multe vezicule, fiecare din ele cu scolecși numeroși.

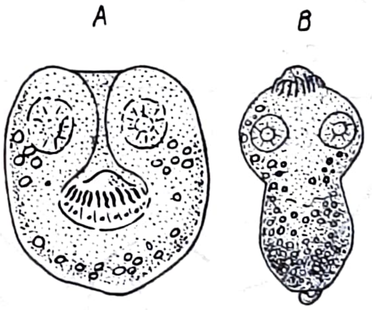


Fig. 414. — Scolex de *Echinococcus granulosus* din chist hidatic.
A — invaginat; *B* — dezinvaginat (Brumpt și Neveu-Lemaire, 1951).

Chistul hidatic este alcătuit din membrana cuticulară, o membrană proligeră sau germinativă și un lichid hidatic, care conține nisip hidatic. *Membrana cuticulară* are culoarea albă ca albușul de ou fiert. Este stratificată și nu are structură de țesut. Prezintă elasticitate și, secționată, se răsucește. Membrana chistului viu este impermeabilă pentru germeni microbieni, dar permite dializa unor substanțe minerale și organice, fenomen important în imunobiologia bolii. *Membrana proligeră* sau germinativă este interioară față de cuticulă. Ea reprezintă un sincițiu cu numeroși nuclei. Membrana proligeră este elementul viu și proliferativ al chistului. Din membrana proligeră se vor forma veziculele-fiice, veziculele proligere și scolecșii. *Veziculele proligere* se formează prin înmugurirea membranei germinative către interiorul chistului și pătrunderea membranei cuticulare în mugure. Mugurele crește, devine el însuși chistic, se desprinde de peretele hidatidei și are o structură inversă față de peretele chistului. Astfel vezicula proligeră prezintă la interior membrana cuticulară și la exterior membrana proligeră. Dimensiunile veziculelor proligere sînt mici, pînă la 1 mm. În interiorul veziculei proligere se vor forma *scolecșii* (fig. 414). Scolecșii sînt invaginați; au o formă ovalară. Ei prezintă o coroană de cîrlige net vizibilă la microscop, situată către mijlocul scolecsului. Unele vezicule proligere se rup, iar scolecșii sînt puși în libertate. Dintre scolecșii liberi unii degenerează și mor. Aceștia se numesc *metascolecși*. Cei vii se numesc *ortoscolecși*. Veziculele proligere și scolecșii liberi în cavitatea chistului sedimentează în regiunea joasă, alcătuind *nisipul hidatic.* Pe lîngă vezicule proligere și scolecși, chistul formează și *vezicule-fiice.* Acestea au structura chistului hidatic, adică prezintă la exterior membrana cuticulară și la interior membrana proligeră. Veziculele-fiice pot să ia naștere din peretele chistului hidatic, din transformarea și veziculizarea unui scolex sau din vezicula proligeră, care se căptușește în interior cu membrană proligeră. Veziculele-fiice au capacitatea să crească în dimensiuni și să formeze la rîndul lor, în interior, alte vezicule proligere cu scolecșii lor. Veziculele-fiice se formează în interiorul chistului sau în exterior. Veziculele-fiice și scolecșii veziculizați sînt răspunzători de hidatidoza secundară, care apare ca urmare a ruperii unui chist hidatic primitiv.

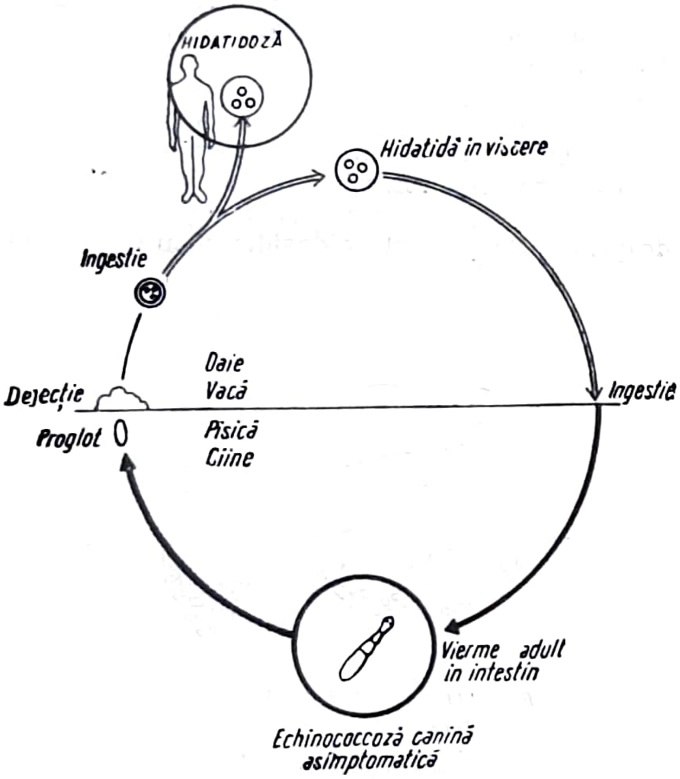


Fig. 415. — Echinococcus granulosus, ciclu biologic.

Lichidul hidatic umple cavitatea chistului. Lichidul este incolor, limpede. Datorită acestor calități, lichidul hidatic a fost comparat cu „apa de stîncă". Reacția lichidului este ușor alcalină; conține săruri, glucide și albumine. Este un bun mediu de cultură pentru germeni microbieni, dar se menține steril atîta vreme cît membranele chistului sînt intacte.

Pe lîngă elemente care țin de structura proprie, chistul mai prezintă un înveliș exterior, numit *membrana adventice,* de izolare, care rezultă din reacția inflamatoare a organismului gazdă.

Ciclul biologic. (fig. 415). Gazda obișnuită a teniei adulte este reprezentată de cîine și pisică. Echinococoza acestor animale trece deseori neobservată. Animalele elimină proglotele cu ouă. Embriofori pătrunși în tubul digestiv al unei gazde favorabile, mai ales dintre ovine și bovine, va elibera embrionul, care pe cale portală va ajunge în ficat sau va trece mai departe, ajungînd în plămîn. Forma larvară, chistul hidatic, se va dezvolta astfel, la început sub forma unui *acefalochist,* adică o hidatidă fără scolecși, iar ulterior, o dată cu apariția veziculelor proligere și a scolecșilor, hidatida devine infestantă pentru gazda definitivă carnivoră. Chistul hidatic ingerat de cîine sau pisică o dată cu ficatul crud sau alte organe de vită parazitate va ocaziona introducerea în tubul digestiv a nenumărați scolecși. Aceștia se vor fixa de peretele intestinal, se vor dezvolta devenind tenii adulte, ciclul evolutiv continuînd o dată cu eliminarea proglotului bătrîn cu fecalele.

Rol patogen. Prezența formei larvare a *E. granulosus* în organismul omului este cauza bolii numită hidatidoză. Chistul hidatic se localizează în ficat, plămîn sau mai rar în alte organe. În prima perioadă, cînd chistul nu este dezvoltat, perioadă, uneori destul de îndelungată, diagnosticul afecțiunii este dificil, datorită sărăciei sau nespecificității semnelor clinice. În perioada inițială predomină manifestările toxice. Ulterior, o dată cu dezvoltarea chistului apar fenomene locale de compresiune. Evolutiv, chistul hidatic poate să meargă spre o vindecare spontană, care duce la calcificarea finală a resturilor chistului. Un chist fisurat poate să se infecteze secundar, formînd un abces. O complicație gravă în evoluția chistului hidatic este ruperea spontană sau traumatică a peretelui chistic, cu diseminarea conținutului de vezicule proligere și scolecși în jur, accident care poate să dea naștere *hidatidozei secundare.* Ruperea chistului hidatic într-o cale comunicantă cu exteriorul poate să ducă la eliminarea conținutului chistic din organism, cum este cazul vomicii hidatice, ca urmare a spargerii chistului în căile respiratorii și altele.

Epidemiologie. Hidatidoza este o zoonoză tipică. Circuitul epidemiologic normal este între cîine și ierbivore. Omul intră numai accidental în acest circuit şi nu constituie sursa normală de infestare pentru cîine. Embrioforii de *E. granulosus* sînt foarte rezistenţi timp îndelungat în mediul extern. Omul poate să se infesteze direct de la animalul purtător de tenie; embrioforii se găsesc pe picioare şi în blana cîinelui murdărită cu propriile lui fecale. Contagiul poate să fie indirect, o dată cu tunderea sau prelucrarea lînii oilor murdărite cu fecale de cîine. Un rol important în infestarea omului îl prezintă apa şi alimentele contaminate. Muştele şi rozătoarele sînt diseminatori mecanici ai embrioforilor. În prezent se studiază rolul infestant al conţinutului hidatic introdus în organism prin anumite căi.

De un interes deosebit în hidatidoză este problema focarelor naturale de boală. Leikina (1957), Boev (1958) şi alţi cercetători sovietici au studiat echinococoza şi hidatidoza la animalele sălbatice şi legăturile care există între focarele naturale de boală şi cele sinantrope. În natură, lupii şi vulpile pot să fie purtătorii teniei adulte, iar ierbivorele sălbatice purtătorii de hidatide. În privinţa hidatidozei umane nu trebuie să se piardă din vedere aspectul profesional al îmbolnăvirilor, care determină în mare măsură răspîndirea bolii la anumite grupe de populaţie.

În ţara noastră, incidenţa hidatidozei umane este destul de ridicată în unele regiuni. Hidatidoza la animale se ridică la o incidenţă de pînă la 30% pentru bovine şi 40% pentru ovine.

Diagnostic de laborator. Diagnosticul de laborator al hidatidozei umane se bazează în special pe metodele imuno-biologice şi mai puţin pe identificarea elementelor parazitare în produsele organismului prin examene de laborator.

Scolecşi sau cîrlige pot să fie identificate în spută sau vomică, în sedimentul urinar, în scaun sau în lichidul extras prin puncţionarea chistului. Puncţia chistului hidatic nu este indicată, deoarece poate să ducă la diseminarea scolecşilor sau la apariţia şocului anafilactic prin lichidul din chist pătruns în organism.

Examinarea microscopică a sputei prin *tehnica de concentrare* imaginată de Josip Pasini Libenik pune în evidenţă cîrlige din scolecşi în chisturile hidatice pulmonare, fără semne clinice de perforaţie.

Prin vomică se elimină lichid hidatic, vezicule-fiice de 1—2 cm diametru, fragmente de membrană sau chiar chisturi întregi (Pretdecenski, 1953).

Pentru diagnosticul imunobiologic au fost imaginate multe reacţii, dintre care numai cîteva sînt folosite astăzi.

Reacţia de precipitare Fleig şi Lisbone moficată arată gradul de impregnare antigenică a bolnavului. Reacţia se bazează pe precipitarea serului bolnavului în prezenţa lichidului hidatic.

Reacţia de fixare a complementului Weinberg-Pîrvu, cu antigen lichid hidatic este mai specifică decît reacţia de precipitare. Uneori însă se pozitivează abia în urma unei intervenţii chirurgicale asupra chistului hidatic, ca urmare a impregnării brutale a organismului cu lichidul din hidatidă.

Reacţia de hemaglutinare este o probă indirectă.

Reacţia intradermică Casoni, deşi nu constituie o metodă de diagnostic de laborator, trebuie să fie cunoscută prin importanţa, fidelitatea şi simplitatea tehnicii comportate.

Drept antigen se foloseşte lichidul hidatic, de preferinţă din chisturile umane sau de la bovine, porcine sau ovine.

Se injectează intradermic 0,1—0,2 ml antigen hidatic, încet, cu un ac fin. Citirea se face de 2 ori, prima dată în primele 30 de minute şi a doua oară la 24 de ore.

Reacţia precoce pozitivă care apare pînă în 30 de minute arată o stare de alergie constantă la un purtător de chist hidatic nefisurat. Reacţia precoce corespunde sensibilizării bolnavului la fracţiunile antigenice filtrabile ale lichidului hidatic prin membranele chistului, fracţiuni care difuzează lent şi continuu. Reacţia tardivă pozitivă indică o impregnare brutală a organismului cu lichid hidatic total, ca urmare a ruperii sau fisurării chistului.

Reacţia Casoni este deosebit de sensibilă, dînd rezultate pozitive la 90% din bonlavi. False reacţii pozitive pot să apară la persoane cu hipereactivitate cutanată, în cazuri de sensibilitate exagerată faţă de conservantul folosit la repetarea înainte de două săptămîni a intradermoreacţiei. De asemenea pot să apară reacţii pozitive la purtătorii de tenii sau tumori maligne. Greşeli de tehnică prin injectarea de cantităţi mai mari decît cele indicate pot să ducă de asemenea la erori de diagnostic. False reacţii negative pot să apară la purtătorii de chisturi hidatice cu hiposensibilitate dermică şi epuizare de anticorpi, în tulburări ale pielii, la anergici, sau folosind antigen vechi. Intradermoreacţia este cea mai fidelă probă de diagnostic în hidatidoză, în afara formelor osoase de boală.

Metodele de diagnostic imunobiologic ne permit să diferenţiem în hidatidoză două forme anatomo-clinice. Chistul hidatic *imunoselectiv* a cărei cuticulă este intactă şi permite filtrarea unor anumite fracţiuni din lichidul hidatic, se manifestă printr-o reacţie de fixare a complementului negativă şi o reacţie Casoni precoce pozitivă şi tardiv negativă. *Chistul hidatic imunoactiv*, a cărui cuticulă este ruptă sau fisurată, se manifestă prin reacţia de fixare a complementului pozitivă, reacţia de precipitare inconstant pozitivă şi reacţia Casoni pozitivă, atît precoce, cît şi tardiv.

Tabloul sanguin în hidatidoză ne arată o eozinofilie inconstantă, dar obişnuit prezentă. Eozinofilia este în special marcată în cazul chisturilor hidatice imunoactive, degenerate, infectate recent, în hidatidoza secundară, în chisturile multiple şi în chisturile unice foarte active. Absenţa unei eozinofilii nete nu exclude însă hidatidoza. În aceste cazuri, de obicei chistul are o vitalitate scăzută şi deci o activitate biologică slabă. Testul Mihailov-Djamanova de cercetare a eozinogramei înainte şi după 30 de minute de la reacţia Casoni arată la purtătorii de chist hidatic o scădere a eozinofilelor de cel puţin 10%. În acelaşi timp, testul scoate în evidenţă o eozinofilie latentă, manifestată la cîteva zile de la injectarea antigenului hidatic, ulterior eozinofilele revenind la nivelul iniţial. Testul este pozitiv şi în teniază.

HIDATIDOZA MULTILOCULARĂ SAU BAVARO-TIROLIANĂ

Echinococcus multilocularis (sin. *E. sibiricensis*)

Hidatidoza multiloculară este afecţiunea datorită prezenţei în corp a formei larvare a teniei *E. multilocularis*.

E. multilocularis şi *E. granulosus* se deosebesc foarte puţin din punct de vedere morfologic. Ciclul evolutiv al *E. multilocularis* este însă diferit, adultul parazitînd vulpile iar formele larvare dezvoltîndu-se la rozătoarele sălbatice şi accidental la om.

Anatomoclinic, hidatidoza multiloculară sau alveolară se prezintă ca o masă compactă, cu multe cavităţi în interior, în care se găsesc scolecşii. Boala se caracterizează prin aspectul invadant al formei larvare în organul afectat şi prin metastazele la distanţă pe care le determină. Gravitatea clinică este deosebită.

Epidemiologic se cunosc cîteva zone de răspîndire a bolii, printre care focarul din Tirol şi focarul natural siberian sînt cele mai importante. De mare importanţă în cercetarea epidemiologică a bolii şi în sprijinul teoriei dualiste, prin care *E. multilocularis* este considerat o specie aparte, sînt cercetările recente ale şcolii sovietice, cercetări conduse de Leikina (1959).

Autorii au reuşit să diferenţieze în natură şi în aşezările omeneşti ciclurile biologice ale *E. granulosus* şi *E. multilocularis*, care păreau suprapuse, recunoscînd drept gazde pentru primul parazit cîinele şi cornutele mari domestice, iar pentru al doilea parazit vulpile şi rozătoarele. Îmbolnăvirile la om sînt determinate de legăturile cu ciclul unuia sau al celuilalt parazit. Hidatidoza multiloculară este o boală tipică în privinţa focalităţii naturale.

Pentru diagnosticul de laborator servesc aceleaşi metode ca şi pentru hidatidoza de tipul chistului hidatic.

HIMENOLEPIDOZA

Himenolepidoza este boala datorită prezenţei în tubul digestiv al omului a helmintului *H. nana*. Foarte rar se întîlneşte la om helmintul *H. diminuta*, specific rozătoarelor.

Hymenolepis nana

Morfologie. *H. nana* este un cestod mic, de 2—4 cm, alb, proglotele lui sînt late şi au porul genital, aşezat pe aceeaşi parte în tot lungul strobilei (fig. 416 şi 417). *Scolexul* este mic, sub 0,5 mm, rotund, cu 4 ventuze şi un rostru cu o singură coroană de cîrlige. Cîrligele sînt mici, egale în mărime şi cu o formă caracteristică. *Aparatul reproducător mascul* este alcătuit din trei testiculi rotunzi, aşezaţi în linie dreaptă, o veziculă seminală şi un organ de copulaţie, cirul. *Aparatul reproducător femel* este alcătuit din două glande germigene situate central, glanda vitelogenă, vaginul şi receptacolul seminal. Uterul are forma de potcoavă. La punctul de unire a germiductului, viteloductului şi uterului se află glanda cojii.

În *proglotul bătrîn*, organele aparatelor reproducătoare sînt atrofiate, rămînînd numai uterul, dezvoltat, cu forma caracteristică, plin cu ouă.

Oul este ovalar, cu diametrul mare de 50—60μ de culoare cenuşie. Oul are o dublă membrană

La exterior prezintă o membrană subţire şi fragilă. În interior se găseşte a doua membrană mai densă, la o distanţă de prima cam de un sfert din mărimea oului. Membrana internă prezintă la poli două proeminenţe, semănînd cu o lămîie. Din fiecare proeminenţă porneşte cîte un mănunchi de 4—8 filamente ca nişte flageli lungi. Filamentele se împletesc între ele în spaţiul dintre cele două membrane ale oului. În interiorul membranei interne se află embrionul ovalar, măsurînd aproximativ 30 μ, mai închis la culoare şi prezentînd 6 cîrlige lungi, dispuse în general două cîte două. Este deci, un *embrion hexacant*.

Cisticercoidul este larva genului *Hymenolepis*. Este o formaţiune alungită, cu o mică cavitate veziculară la un capăt, în care se găseşte invaginat scolexul.

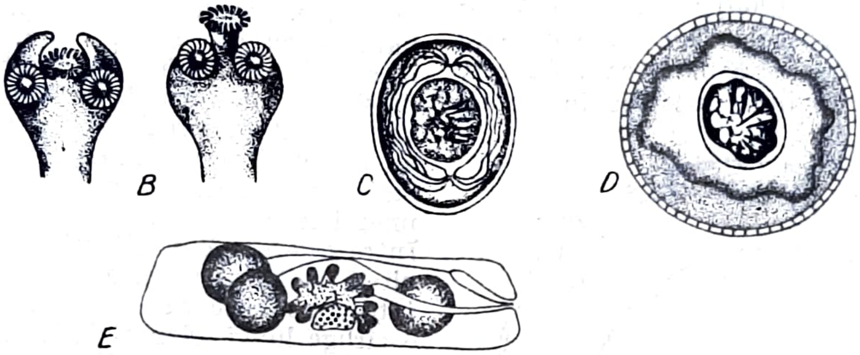


Fig. 416. — *Hymenolepis nana* şi *Hymenolepis diminuta*.
A — lanţ de proglote; *B* — scolex invaginat şi dezinvaginat; *C* — ou de *H. nana*; *D* — ou de *H. diminuta*; *E* — proglot de *H. nana* (*B*, din Georgescu, Steinbach, Simionescu, Belchiţă, 1956; *E*, din Hackett, Buckley, Murgatroyd, 1955).

Ciclul biologic. (fig. 418). Proglotele bătrîne se distrug în intestin, iar ouălele sînt puse în libertate şi se vor găsi în masa fecalelor. Eliminate din organism, ouăle vor fi introduse în tubul digestiv al individului receptiv, iar în jejun îşi vor pierde învelişurile. Embrionul hexacant pătrunde într-o vilozitate intestinală unde se transformă în cisticercoid. Acest stadiu durează cîteva zile, cisticercoidul distruge vilozitatea intestinală, cade în lumenul intestinal şi se prinde cu scolexul de peretele intestinal. În cîteva săptămîni, viermele devine adult şi elimină proglote cu ouă. Pe lîng acest ciclu evolutiv direct, cu o singură gazdă, *H. nana* poate să-şi dezvolte cisticercoidul şi într-o gazdă intermediară care este o insectă. Rol de gazdă intermediară pot să îndeplinească *Xenopsylla cheopis* sau *Tenebrio molitor*. Ingerate, insectele eliberează cisticercoizii în intestinul gazdei definitive.

Rol patogen. Viermele se localizează în partea terminală a intestinului subţire. Gravitatea himenolepidozei este în primul rînd în funcţie de numărul de paraziţi din intestin. În general, boala este destul de gravă. Pe lîngă tulburările digestive pe care le provoacă, deosebit de importante sînt tulburările generale, care ţin în special de sistemul nervos şi de organele de simţuri. Tulburările auditive şi vizuale sînt frecvente. Tulburările de acomodare vizuală sînt capricioase şi pot să inducă deseori în eroare pe medic. Starea de nervozitate este frecventă. Uneori apar crize comiţiale sau crize de meningism.

Epidemiologie. În himenolepidoză, contagiul direct cu bolnavul sau indirect prin obiectele din jurul său sînt de primă importanţă. Boala se transmite cu alimentele şi cu mîinile murdare. Rolul muştelor să transmită mecanic ouăle de *H. nana* nu trebuie să fie desconsiderat. Datorită faptului că în general himenolepidoza are incidenţa crescută la vîrstele mai mici, cînd condiţiile de igienă sînt mai greu respectate, că viermele nu necesită în evoluţia lui o gazdă intermediară şi că bolnavul prin autoinfestare se vindecă greu şi reprezintă o sursă de infestare lungă, himenolepidoza are caracterul unei boli de colectivitate sau de familie.

Fig. 417. — Hymenolepis nana. Adulţi (mărit de 2 ori) (din Predtecenski, 1960).

Pentru himenolepidoză s-a pus problema existenţei unei surse de infestare printre animalele din jurul omului. Ipoteza este susţinută de asemănarea marcată dintre *H. nana* şi *H. fraterna*, parazit al şobolanului. Se pare că totuşi cele două specii sînt biologic deosebite şi adaptate la gazde diferite. Pavlovski este unul dintre susţinătorii teoriei dualiste.

În ţara noastră, himenolepidoza este una dintre helmintozele răspîndite. Lupaşcu, Ungureanu şi colaboratorii (1960) arată că himenolepidoza ocupă al patrulea loc ca frecvenţă medie între verminoze. Răspîndirea bolii este inegală în diferite regiuni, existînd focare de maximă infestare în zona de mijloc a Dobrogei, în mediul rural al regiunii Bucureşti şi în sudul Moldovei.

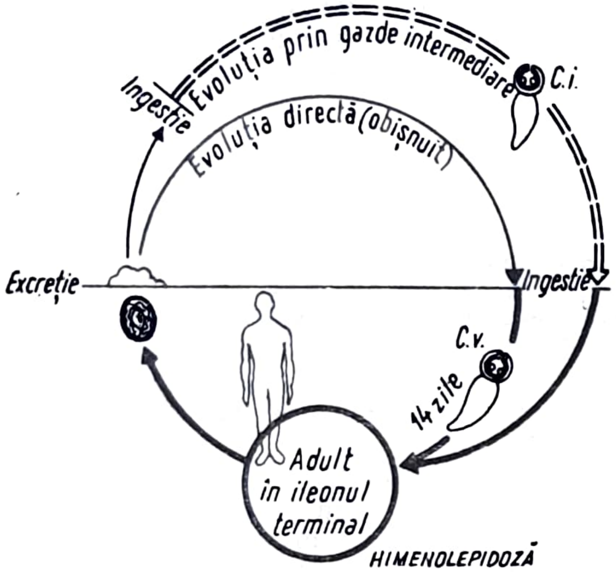

Evoluţia prin gazde intermediare
C.i.
Ingestie
Evoluţia directă (obişnuit)
Excreţie
Ingestie
C.v.
14 zile
Adult în ileonul terminal
HIMENOLEPIDOZĂ

Fig. 418. — *Hymenolepis nana*, ciclu biologic.
Ci — cisticercoid în gazda intermediară (insectă); *cv* — cisticercoid în vilozitatea intestinală (ileon anterior) → evoluţia în gazda definitivă, → trecerea prin mediul fizic extern, ⇛ evoluţia posibilă în gazda intermediară.

Diagnostic de laborator. *Examenul coprologic direct* sau *prin metoda de concentrare Willis* pune în evidenţă ouăle de *H. nana.* Structura caracteristică a oului de *Hymenolepis* îl face uşor de recunoscut. Totuşi, examenul coprologic trebuie să fie efectuat cu atenţie, deoarece ouăle sînt transparente, au un contur foarte fin şi pot să treacă uneori neobservate.

Reacţia de precipitare şi *reacţia de fixare a complementului* sînt specifice în titruri mari. Hacig, Solomon şi Weinbach (1959) au studiat comparativ cele două metode de diagnostic în ţara noastră.

Tabloul sanguin arată o *hipereozinofilie* netă, uneori foarte pronunţată.

Hymenolepis diminuta

H. diminuta este un cestod de 40—60 cm lungime, de culoare albă (fig. 419). Scolexul este rotund, cu 4 ventuze şi nu prezintă armătură de cîrlige. Organizarea unei proglote este asemănătoare cu cea a *H. nana.* Proglota bătrînă este mai mult lată decît înaltă. *Oul* este mare, de 60—80 μ, rotund, cu două membrane. Învelişul extern prezintă o structură radiară şi un contur intern ondulat. Învelişul intern este mai depărtat de cel extern decît la *H. nana* şi uneori lasă se se vadă două ridicături polare. Între cele două învelişuri se observă substanţa vitelină fără filamente. În interiorul învelişului intern se observă *embrionul hexacant* cu cele 6 cîrlige lungi, clar vizibile, dispuse în perechi. Oul are culoarea galbenă-brună şi este mai puţin transparent decît oul de *H. nana. Cisticercoidul* este asemănător cu cel al *H. nana.*

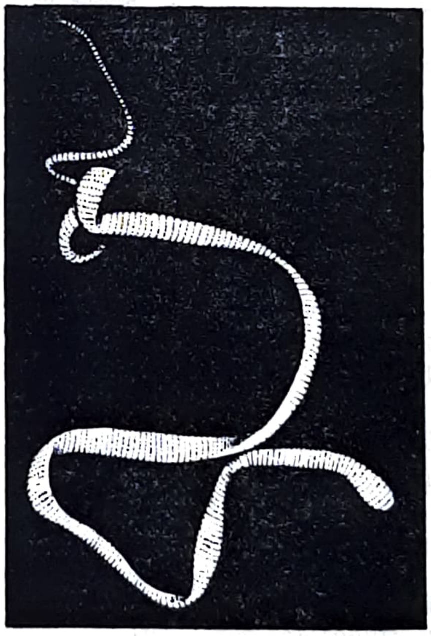


Fig. 419. — *Hymenolepis diminuta.* Adult (mărime naturală) (din Predtecenski, 1960).

H. diminuta necesită o gazdă intermediară, care este o insectă: *Asopia farinalis*, *Tenebrio molitor*, *Xenopsylla cheopis*, *Ceratophyllus fasciatus* ş.a. În aceste insecte se dezvoltă cisticercoidul. Gazda definitivă, şobolanul, se infestează ingerînd insecte purtătoare de cisticercoizi. Niţulescu şi colaboratorii presupun că evoluţia viermelui poate să se desfăşoare şi fără gazdă intermediară, direct prin ingerarea ouălor de *H. diminuta* de gazda definitivă.

Diagnosticul de laborator este acelaşi ca şi al himenolepidozei cu *H. nana.*

DILEPINIDOZA

Dipylidium caninum

Dilepinidoza este o helmintoză a cîinelui şi pisicii, provocată de prezenţa viermelui adult în intestin. Excepţional parazitul a fost identificat la om.

Morfologic. *D. caninum* este un cestod de talie mică, sub 50 cm, alb, cu proglote caracteristice, ca nişte seminţe de bostan. Scolexul este romboidal, cu 4 ventuze şi un rostru lung, retractil, cu 3—5 coroane de cîrlige ca nişte spini, care se desprind uşor de baza lor. Proglotele adulte sînt alungite. Aparatul reproducător mascul şi femel este dublu, deschizîndu-se în două papile genitale simetrice, laterale. Aparatul reproducător mascul este reprezentat printr-un număr mare de foliculi testiculari, de la care pornesc canalele aferente, care se unesc în două canale deferente care se îndreaptă lateral spre papilele genitale unde întîlnesc punga cirului. Aparatul reproducător femel este reprezentat prin două glande germigene, două germiducte care întîlnesc fiecare vaginul de partea corespunzătoare. Glandele vitelogene, mici, se deschid în două viteloducte, care întîlnesc germiductele în răspîntia genitală, de unde porneşte şi uterul. Uterul are forma unei reţele care acoperă toată partea mediană a proglotei anterior şi posterior. În ochiurile uterine se găsesc foliculii testiculari.

Proglota bătrînă păstrează din vechea organizare papilele genitale cu ductele care pornesc şi sosesc spre ea şi uterul sub forma unor capsule diseminate, pline cu ouă.

Oul de *D. caninum* este rotund, de 40—50 μ, brun-roşcat. Oul are un dublu înveliş. Membrana externă, subţire, este despărţită de membrana internă printr-o masă vitelină. În interiorul învelişului intern se observă embrionul hexacant. Culoarea este brună. Ouăle sînt grupate mai multe la un loc în capsulele uterine sau ovigere, care au forma ovalară şi o membrană de înveliş, subţire, transparentă.

Ciclul evolutiv. Proglotele se elimină întregi din organism, dar prin mişcările lor puternice de contracţie expulzează capsulele ovigere în fecale. Oul ingerat de insecte ca *Trichodectes canis* sau *Ctenocephalus canis*, *Pulex iritans* va evolua în forma larvară, cisticercoid. Rolul insectei *Trichodectes canis* drept gazdă intermediară principală a fost descoperit de Melnikov. Gazda definitivă se infestează ingerînd insectele purtătoare de cisticercoizi.

Rol patogen. Dilepinidoza umană este rară. Boala apare mai ales la copii, drept urmare, probabil, a condiţiilor de igienă mai puţin respectate la această vîrstă.

Diagnostic de laborator. Examenul coprologic direct sau prin metoda de concentrare Telemann pune în evidenţă capsulele ovigere, uşor de recunoscut.

BOTRIOCEFALOZA

Diphyllobothrium latum

Botriocefaloza este boala datorită prezenţei în tubul digestiv al omului a cestodului adult *D. latum.* Cestodul, în faza adultă, nu este specific omului, putînd să fie întîlnit şi la animale carnivore sălbatice sau domestice. Epidemiologic, focarele de boală sînt legate de colecţiile de apă unde trăiesc gazdele intermediare.

Morfologia parazitului. Botriocefalul este un cestod mare, lungimea lui depăşind uneori 10 m. Este albicios. Pe fiecare proglotă se observă un punct mare central, de culoare mai închisă, care este uterul şi care desenează o linie în lungul viermelui (fig. 420). Scolexul este mare de cîţiva milimetri, ovalar, prezintă două şanţuri adînci laterale numite botridii, cu ajutorul cărora botriocefalul se prinde de mucoasa intestinală. Strobila este alcătuită dintr-un număr mare de proglote late. Proglotele au 2—4 mm înălţime şi 10—12 mm lăţime.

Aparatul reproducător mascul este reprezentat prin numeroşi foliculi testiculari situaţi lateral în regiunea medulară, canale aferente care converg spre vezicula seminală, aşezată median, şi canalul deferent, care se îndreaptă anterior spre punga cirului. Porul genital este situat median şi anterior. *Aparatul genital femel* este alcătuit din două glande germigene cu două germiducte care converg spre germiductul comun, un număr mare de foliculi vitelogeni situaţi lateral în zona corticală, de la care pornesc viteloducte care se unesc în viteloductul comun, un vagin cu direcţie antero-posterioară pornind din papila genitală şi un uter sinuos, cu direcţia postero-anterioară deschizîndu-se spre exterior printr-un orificiu propriu, numit tocostom. Germiductul comun, viteloductul comun, vaginul și uterul se reunesc în răspîntia genitală lîngă glanda cojii.

Proglotele bătrîne ale botriocefalului nu sînt pline cu ouă ca ale *T. saginata* sau *T. solium*. Ouăle se elimină pe rînd din uter prin tocostom, iar proglotele bătrîne degenerează.

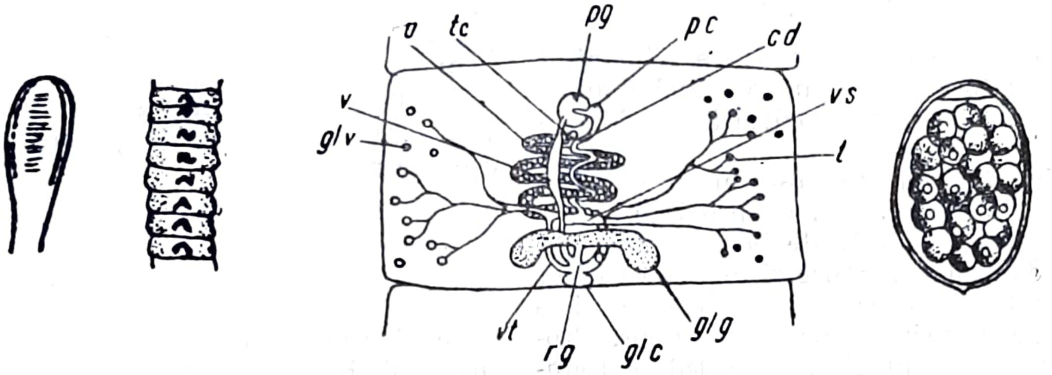


Fig. 420. — Diphillobothrium latum

A — scolex; *B* — lanț de proglote; *C* — proglot adult; *D* — ou; *glv* — glandă vitelină; *v* — vagin; *u* — uter; *tc* — tocostom; *pg* — por genital; *pc* — punga cirului; *cd* — canal deferent; *vs* — veziculă seminală; *t* — testicule; *glg* — glandă germigenă; *glc* — glanda cojii; *rg* — răspîntie genitală; *vt* — viteloduct.

Oul este ovalar, mare, avînd dimensiuni de 70 μ lungime și 45 μ lățime, colorat în galben-brun. Învelișul oului este bine marcat și prezintă la unul dintre poli un mic căpăcel numit opercul, iar la polul opus se găsește uneori o mică proeminență exterioară, ca un apendice punctiform. Oul la emisiune nu este embrionat. În ou se observă o masă vitelină granulară.

Ciclul biologic (fig. 421). Ouăle eliminate din proglotă se vor găsi în număr mare în scaun. Ajunse în apă, embrionarea are loc în timp de cîteva săptămîni. Embrionul părăsește oul împingînd operculul și ajunge liber în apă. Embrionul liber numit *coracidium* este sferic, are 40—50 μ și prezintă în interior 6 cîrlige. Este deci un embrion hexacant. Embrionul este învelit de o membrană subțire, cu numeroși cili vibratili. Cu ajutorul cililor, embrionul se deplasează în apă. Coracidiul trăiește liber în apă cîteva zile. Evoluția continuă în prima gazdă intermediară, care este un crustaceu *Cyclops strenus* sau *Diaptomus gracilis*. Crustaceul ingerează coracidiul în apă. Embrionul ajuns în tubul digestiv trece activ în cavitatea generală a crustaceului, unde începe să crească și se transformă într-o *larvă procercoidă*. Această larvă este alungită și are aproximativ 500 μ; la un capăt prezintă un apendice sferic, în care se disting cele șase cîrlige, iar la extremitatea opusă, o înfundătură, schița viitoarelor botridii. Următorul stadiu larvar se va dezvolta în anumiți pești, care ingerează crustacee purtătoare de larve procercoide. Larva liberată în intestinul peștelui va trece activ în musculatură sau în organe, îndeosebi în ovare, unde se va transforma în *larvă plerocercoidă*, de 1—2 cm lungime, cu aspect vermiform. La un capăt, larva are două botridii, iar pe corp se distinge schița viitoarei segmentări în proglote. Larva plerocercoidă este parenchimatoasă, plină, fără urme de veziculizare. În privința biologiei larvei plerocercoide este deosebit de interesant faptul că larvele ingerate o dată cu noua gazdă de alt pește nu se digeră, ci străbat peretele stomacal al ultimei gazde, localizîndu-se din nou în musculatură sau viscere. Fenomenul, denumit de Pavlovski transplantare pasivă, are drept urmare concentrarea larvelor plerocercoide în peștii ihtiofagi. În afară de pești, broaștele pot să constituie și ele gazda larvei plerocercoide. Larva plerocercoidă ingerată de om sau de animalele receptive, o dată cu carnea sau icrele de pește, se va elibera și se va fixa de peretele intestinal, începînd să crească și devenind botriocefal adult.

Rol patogen. Botriocefaloza se manifestă clinic sub două aspecte. În mod obișnuit, prezența botriocefalului în tubul digestiv al omului se întovărășește de o simptomatologie nespecifică, asemănătoare celei din tenioză. Alteori, botriocefaloza îmbracă forma unei anemii de tip pernicios, intensă, cu hemoragii, paloare, tulburări grave digestive și circulatorii. Anemia botriocefalică este datorită unei stări hipertoxice din partea parazitului, sau unei sensibilități marcate a gazdei. Razumova (1957) afirmă că forme ușoare de anemie apar la 50% dintre purtătorii de botriocefali, dar anemia de tip pernicios este cu mult mai rară, sub 3%. În țara noastră, anemiile grave sînt și mai rare.

Epidemiologie. Răspîndirea botriocefalozei este legată de anumite zone geografice, unde există mari suprafețe de apă stătătoare cu posibilități de poluare, în care trăiește o bogată faună piscicolă. Există deci anumite focare de botriocefaloză, cum sînt zonele din jurul golfului Botnic și Finic, delta Dunării și Volgii, lacurile din Elveția și Italia nordică etc. În țara noastră, botriocefaloza este aproape la fel de frecventă ca și teniaza. Focarul principal de boală, în care se asigură și se menține ciclul biologic, este reprezentat de Deltă și zona marilor lacuri din cursul inferior al Dunării. Al doilea focar, cu mult mai redus este în zona Dunării, la Corabia. Ungureanu și colaboratorii (1959) clasifică epidemiologic cazurile de botriocefaloză în două grupe, deosebind îmbolnăvirile autohtone, cele din zonele în care ciclul biologic al parazitului este asigurat de îmbolnăvirile de import, care apar peste tot în afara zonelor endemice la persoane care au pătruns temporar în focarul endemic sau au consumat produse de pește în restul țării. În afară de om, în Delta Dunării, cîinele, pisica și porcul au fost identificați drept gazde ale viermelui adult. În alte țări, vulpea, tigrul, ursul alb, foca ș.a., au

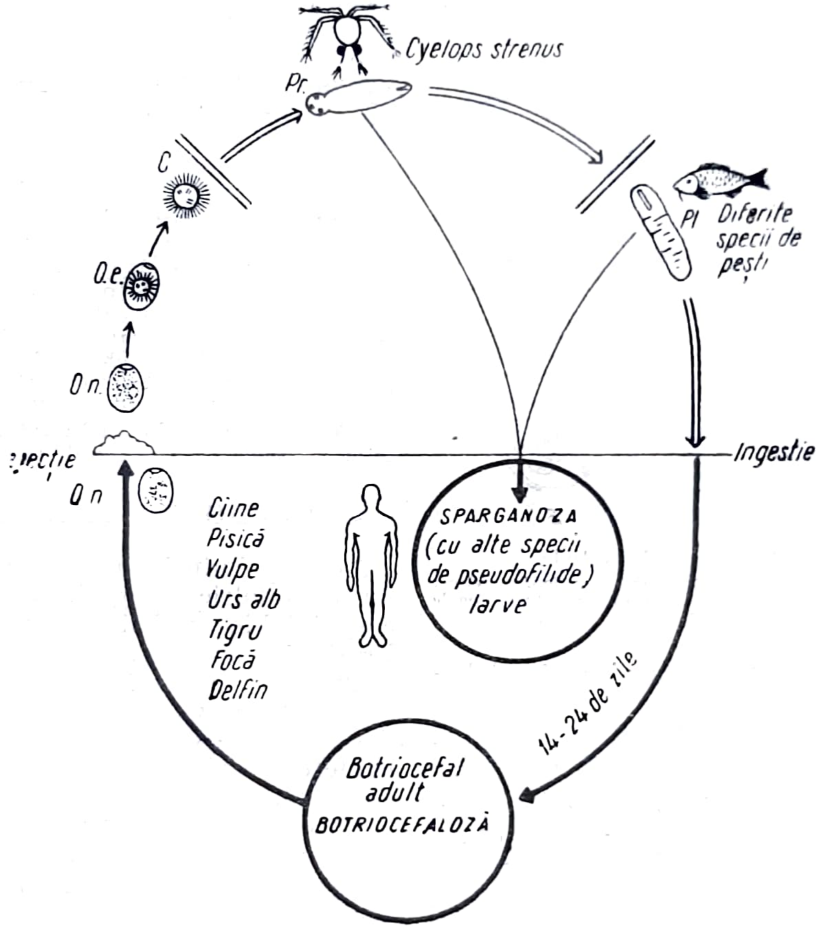

Cyclops strenus
Pr.
C
O.e.
O n.
Pl
Diferite specii de pești
ejecție
O n
Ingestie
Cîine
Pisică
Vulpe
Urs alb
Tigru
Focă
Delfin
SPARGANOZA
(cu alte specii de pseudofilide)
larve
14-24 de zile
Botriocefal adult
BOTRIOCEFALOZĂ

Fig. 421. — *Diphillobothrium latum*, ciclul biologic.
On — ou neembrionat; *Oe* — ou embrionat; *C* — coracidium liber în apă; *Pr* — larvă procercoidă în crustaceu; *Pl* — larvă plerocercoidă în pește ⟶ evoluția în gazda definitivă. → evoluția în mediul fizic extern ⇉ evoluția în gazdele intermediare.

fost descoperite ca purtătoare de botriocefali. Botriocefaloza este deci, o boală cu focalitate naturală.

Gazdele intermediare pentru larvele plerocercoide în ţara noastră sînt multe specii de peşti, dintre care cei mai frecvent parazitaţi sînt ştiuca, bibanul şi mihalţul.

Infestarea omului are loc în special prin consumul de icre sau de carne crudă sărată de ştiucă (Epstein, 1957 ; Ungureanu şi colaboratorii, 1959).

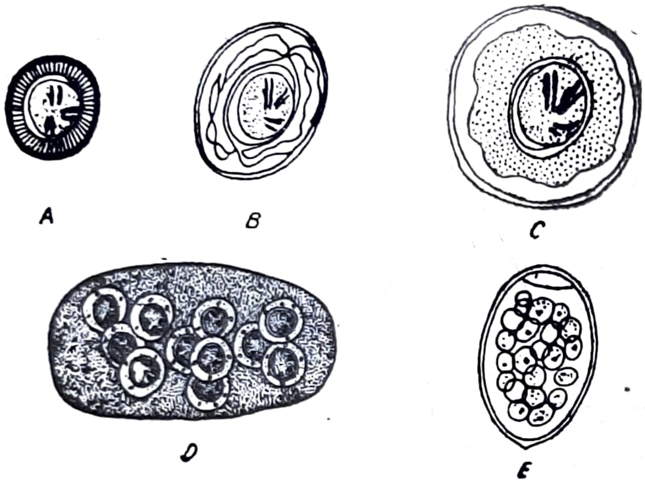


Fig. 422. — Embriofori şi ouă de cestode.

A — embriofor de tenie; *B* — ou de *Hymenolepis nana*; *C* — ou de *Hymenolepis diminuta*; *D* — ouă de *Dipylidium caninum*, în capsula ovigeră; *E* — ou de *Diphyllobothrium latum* (*D*. din Hackett ş.a., 1955).

Diagnosticul de laborator. Prin *examenul macroscopic* se poate pune diagnosticul etiologic de certitudine al bolii. Proglotele de *D. latum* nu se elimină niciodată izolate, ci în lanţuri. Proglotele se recunosc prin faptul că sînt mai mult late decît lungi şi prin prezenţa în mijlocul fiecărei proglote a unei pete opace şi mai brune, care este uterul.

Examenul coprologic microscopic prin metoda directă sau prin metoda de concentrare Telemann-Langeron pune în evidenţă ouăle care se elimină permanent în scaun. Între ouăle operculate, oul de botriocefal este mai mic decît cel de fasciolă şi mai mare decît cel de dicrocel (fig. 422). Ouăle apar în scaun după 2—3 săptămîni de la infestare.

Tabloul sanguin ne arată o diminuare a numărului hematiilor. În general, anemia este uşoară sau moderată, cu 3—4 milioane de hamatii/mm³. Formele grave de anemie, cu un număr sub 2 sau chiar 1 milion de hematii, sînt extrem de rare. În anemia botriocefalică clasică, valoarea globulară este crescută. Razumova (1957) găseşte cifre de 1,8—2 pentru valoarea globulară. Se observă de asemenea anizocitoză, poichilocitoză, normoblaşti şi megaloblaşti. O uşoară leucopenie însoţeşte uneori diminuarea numărului hematiilor (Razumova). Viteza de sedimentare a hematiilor este în general uşor crescută. Eozinofilia este de mică importanţă în diagnosticul botriocefalozei. Eozinofilele încep să crească procentul la două săptămîni şi ating maximum (10—17%) după şase săptămîni de la infestare.

SPARGANOZA

Sparganoza este boala datorită prezenţei în organism a larvei plerocercoide a unei specii oarecare de botriocefal. Infestarea omului are loc în urma ingerării ciclopilor purtători de larve procercoide o dată cu apa sau prin reîncapsularea unei larve plerocercoide care se găseşte în carnea gazdei vertebrată. Frecvent sparganoza este datorită larvei *Sparganum mansoni*. Boala îmbracă diferite forme clinice, localizarea sparganilor în ţesutul conjunctiv subperitoneal sau subcutanat fiind frecventă. Localizarea oculară este caracteristică sparganozei din sud-estul Asiei. În ţara noastră Zotta a diagnosticat un caz de sparganoză.

ÎNCRENGĂTURA NEMATHELMINŢI

Nemathelminţii sînt viermi nesegmentaţi, de formă cilindric-alungită, cu axul longitudinal al corpului bine definit şi cu simetrie bilaterală. Prezintă o cavitate generală plină cu lichid perienteric; această cavitate nu este însă căptuşită cu mezoteliu, deci reprezintă un pseudocel. Sexele sînt separate. Nemathelminţii se caracterizează în evoluţia lor prin năpîrliri repetate.

Corpul viermelui este acoperit cu o *cuticulă* chitinoidă. Sub cuticulă se află *hipodermul*, cu patru îngroşări longitudinale, două laterale, una dorsală şi una ventrală, împărţind corpul viermelui în patru cîmpuri, asemănătoare unor felii alungite. În aceste cîmpuri este dispusă musculatura. *Pătura musculară* a nemathelminţilor este de trei tipuri: *polimiar* cu celule conjunctive musculare numeroase, fiecare celulă avînd o talpă contractilă lipită de hipoderm, un gît contractil şi un corp celular conjunctiv; *meromiar*, cu celule musculare puţine şi lipsite de gîtul îngust dintre talpă şi corpul celulei; *holomiar*, cu celule musculare mici, egale ca nişte fibrile numeroase şi dispuse în manşon.

Tubul digestiv este alcătuit din esofag, intestin şi rect. Esofagul prezintă o alcătuire caracteristică. Unele nematode au esofagul alungit, de tip *strongiloid*, cu o singură umflătură; altele prezintă esofagul de tip *rabditoid*, adică cu două umflături succesive și separate printr-o gîtuitură.

Aparatul reproducător este de tip tubular, diferitele segmente ale tubului jucînd pe rînd rol de glande sexuale, ducte și organe de copulație.

Nematodele se împart în două clase: *Aphasmidia*, care nu au chematoreceptori caudali, și clasa *Phasmidia*, cu chematoreceptori caudali.

Din prima clasă fac parte *Trichinella spiralis* (familia *Trichinellidae*; femela vivipară, adultul în mucoasa intestinală, larva încapsulată în mușchii aceleiași gazde). *Tricocephalus trichiurus* sau *Trichuris trichiura* (familia *Trichocephalidae*, partea anterioară a corpului este subțire, partea posterioară mai groasă).

Din a doua clasă fac parte *Strongyloides stercoralis* (familia *Strongyloididae*, forme strongiloide parazite și forme rabditoide libere), *Ancylostoma duodenale* și *Necator americanus* (familia *Ancylostomidae*, capsula bucală bine dezvoltată și armată cu lame și cîrlige, mascul cu pungă copulatoare), *Trichostrongylus colubriformis* (fam. *Trichostrongylidae*, fără capsulă bucală, punga copulatoare largă), *Enterobius vermicularis* (fam. *Oxyuridae*, helminți mici, cu buton cefalic, extremitatea posterioară a femelei ascuțită), *Ascaris lumbricoides* (fam. *Ascarididae*, helminți mari, cu trei buze orale), *Wuchereria bancrofti*, *W. malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Loa loa* (fam. *Acanthocheilnematidae*, helminți filariformi, femela depune embrioni, microfilarii), *Dracunculus medinensis* (fam. *Dracunculidae*, femela mult mai lungă decît masculul, vivipare) și altele.

TRICHINOZA SAU TRICHINELOZA

Trichinella spiralis

Trichinoza este boala datorită adultului și larvei nematodului *T. spiralis*. În unele cazuri boala are o formă gravă, cu febră, simptome gastro-intestinale iar prognosticul este rezervat; în alte cazuri, boala evoluează asimptomatic. Trichinoza este o zoonoză tipică. Omul, consumînd carne de porc crudă, intră accidental în ciclul biologic al parazitului, fără să contribuie la închiderea acestui ciclu în natură.

Morfologia parazitului. Masculul are 1,5—2 mm. Extremitatea posterioară este dreaptă și prezintă două apendice conice. Orificiul bucal se situează la extremitatea anterioară a corpului. Esofagul este de tip strongiloid. Tubul digestiv se deschide terminal în cloacă, între cele două apendice posterioare. Aparatul reproducător este format dintr-un tub cu rol de testicul și canal deferent, deschizîndu-se în cloacă. Musculatura este de tip holomiar.

Femela are 3—4 mm. Este mai subțiată anterior și mai groasă și rotunjită posterior. Aparatul reproducător, tubular, începe cu rol de ovar, continuă cu oviductul, uterul și vaginul și se deschide în cincimea anterioară a corpului prin orificiul vulvar.

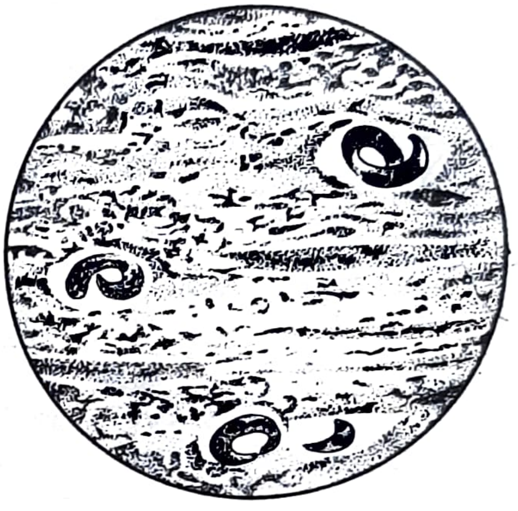


Fig. 423. — Trichinella spiralis. Larve în mușchi, mărit de 65 de ori (din Predtecenski, 1960).

Ouăle au 20 µ diametru, sînt prevăzute la exterior cu o membrană foarte subțire și se întîlnesc numai în uterul femelei.

Larvele ieșite din ou au 90—100 µ și sînt foarte subțiri (fig. 423). Larva închistată în mușchi are 800—1 000 µ, este răsucită în spirală, în chisturi. Chisturile sînt ovalare, diseminate în mușchii striați ai gazdei. Larvele închistate au organizare internă avansată, în special în privința aparatului reproducător.

Chisturile au 300—800 µ, sînt ovalare și prezintă la cele două extremități cîte un mic tubercul, ceea ce dă chistului asemănarea cu o lămîie. Peretele chistului este stratificat.

Ciclul biologic (fig. 424). Ingerarea de carne cu chisturi de trichină va avea drept rezultat eliberarea larvelor în intestin. Paraziții se localizează în ileonul terminal și rareori în cec. Într-un interval foarte scurt, larvele se transformă în adulți, organele reproducătoare se dezvoltă şi are loc acuplarea. După 6—7 zile, femela depune în uter embrionii eclozaţi din ou în prealabil. *T. spiralis* este deci vivipară. Liberarea embrionilor are loc în peretele intestinal, după ce mai întîi femela a pătruns în grosimea acestui perete. Embrionii, pe calea venei porte, transperitoneal, sau direct prin căile limfatice, vor ajunge în circulaţia generală şi se vor opri la nivelul unui muşchi, pătrunzînd în interiorul fibrelor musculare şi provocînd o reacţie locală din partea muşchiului. În cîteva săptămîni se organizează un perete al chistului, se formează un conţinut lichid, iar larva se răsuceşte în spirală. În muşchii striaţi, larvele se localizează în special către tendoane. Muşchiul cardiac sau muşchii netezi sînt excepţional sediul chisturilor. Carnea cu chisturi de trichină, ingerată de o nouă gazdă, va libera larvele în intestin şi ciclul biologic va continua astfel. *T. spiralis* nu necesită în evoluţia ei o gazdă intermediară. Adulţii şi larvele parazitează acelaşi animal. Fiecare generaţie de adulţi şi larve necesită o nouă gazdă.

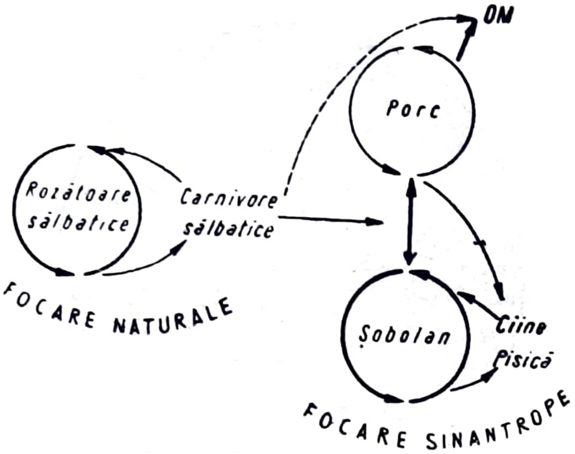


Fig. 424. — Trichinella spiralis, ciclul biologic.

Rol patogen. Trichinoza umană este o boală frecventă, manifestîndu-se uneori sub o formă clinică deosebit de gravă, alteori sub forme inaparente.

Boala evoluează clinic în trei perioade, corespunzătoare etapelor din ciclul biologic al parazitului; prima perioadă, cu manifestări gastrointestinale, corespunde stadiului de parazitism intestinal; ulterior larvele se răspîndesc în sînge. Este momentul în care apar febra, starea generală alterată, edemul feţei, hipereosinofilia, ultima perioadă a bolii, corespunzătoare stadiului de închistare a larvelor în muşchi, se caracterizează prin accentuarea simptomelor anterioare, apariţia mialgiilor, febra putînd să lipsească. Aceasta este perioada critică, în care evoluţia bolii poate să ducă la moartea bolnavului sau spre vindecare. Localizarea de preferinţă a larvelor este în muşchii limbii, diafragm, muşchii umărului şi alţii.

Epidemiologie. Trichinoza este o zoonoză tipică. Boala persistă printre animalele carnivore şi rozătoare. În jurul omului, rezervorul principal al trichinozei este şobolanul. Şobolanii, mîncîndu-se între ei, menţin rezervorul de paraziţi. De la şobolan boala trece la porc şi de la porc la om. De un interes mereu crescînd este focalitatea naturală a trichinozei. Lukaşenko şi Brjeski (1959), Zimoroi (1959), au studiat boala la carnivore şi rozătoare sălbatice, în special în privinţa ciclurilor care se realizează în natură. Între focarele naturale şi cele sinantrope există o întrepătrundere şi o influenţă reciprocă permanentă. În ţara noastră trichinoza a fost diagnosticată la diferite carnivore sălbatice, ca vulpea, lupul, pisica sălbatică, dihorul şi altele, precum şi la rozătoare sălbatice. Oprescu şi Gheorghiu (1959), Lupu şi Cironeanu, au studiat, atît fauna de animale care intră în circuitul bolii în natură, cît şi extinderea şi importanţa focarelor din natură. Asupra rolului animalelor sălbatice în trichinoză sînt concludente procentele ridicate de infestări care s-au constatat la acestea faţă de animalele domestice. Astfel în timp ce mistreţii examinaţi au prezentat 2,1% larve închistate în muşchi, porcii prezintă în general infestări sub 0,1%.

Diagnostic de laborator. *Examenul coprologic*, pentru identificarea paraziţilor adulţi, în urma administrării unui antihelmint şi a unui purgativ, are valoare doar cînd rezultatul este pozitiv. Un rezultat negativ nu infirmă diagnosticul.

Pentru identificarea larvelor în circulaţia sanguină s-a imaginat o metodă de concentrare (reacţia Staubli). Se prelevează 10 ml sînge, se amestecă cu 100 ml soluţie acid acetic 3%, se centrifughează şi se caută larvele în sediment. Reacţia dă foarte rar rezultate pozitive între a 5-a şi a 25-a zi de la debutul bolii, adică în perioada a doua de boală.

Larvele pot să fie întîlnite şi în lichidul cefalorahidian.

Cercetarea microscopică a larvelor închistate într-un fragment recoltat prin *biopsie musculară* constituie o metodă de diagnostic fără riscuri, dar neplăcută. Se alege pentru biopsie în special mușchiul solear lîngă tendonul achilian. Cele mai bune rezultate le dă examenul prin comprimarea fragmentului între două lame, care se fixează prin cleme sau cu două inele de cauciuc. Se pot face de asemenea secțiuni după prealabilă incluzie în parafină sau să se cerceteze larvele în sedimentul obținut prin centrifugare, după digestia artificială a fragmentului de mușchi cu pepsină și acid clorhidric la 30°. Rezultatele negative nu infirmă diagnosticul trichinozei. Metoda are dezavantajul că rezultatele pozitive apar într-un stadiu tardiv al bolii; biopsiile efectuate înainte de a 21-a zi de boală pot să fie negative, pentru că larvele nu au ajuns în mușchi în număr suficient pentru ca să fie ușor descoperite.

Reacțiile imunobiologice sînt prețioase în diagnosticul trichinozei. *Reacția de fixare a complementului* dă rezultate foarte bune.

Reacția de precipitare dă rezultate pozitive mai ales în faza a treia de boală. Inconvenientul metodei constă în faptul că reacția rămîne pozitivă 1—2 ani de la îmbolnăvire, chiar în cazurile inaparente clinic. Ca antigen se folosește un extras de larve de *T. spiralis*. Serul de la bolnav trebuie să fie recoltat steril, nehemolizat și fără hematii. Recoltarea serului se face înainte sau după 24 de ore de la o eventuală reacție intradermică.

Reacția de precipitare în jurul larvelor este o metodă precisă, dar laborioasă. Serul de bolnav recoltat aseptic, în prezența larvelor vii, obținute de la animale de laborator, prin digestie artificială, formează precipitate microscopice în jurul orificiului anal și bucal al larvelor, după o prealabilă incubație la termostat. Reacția este pozitivă după 10—20 de zile de la infestare.

Reacția intradermică cu antigen din larve de *T. spiralis*, deși nu constituie o metodă a diagnosticului de laborator, trebuie să fie cunoscută pentru avantajele practice pe care le oferă. Reacția devine pozitivă după două săptămîni de la îmbolnăvire (11—14 zile) și persistă mai mulți ani (7 ani). Tehnica constă în injectarea strict intradermic a 0,1 ml din antigenul diluat 1/10 000. Reacția pozitivă poate să fie precoce și tardivă. Reacția precoce pozitivă apare în 5—20 de minute și dispare după 30—60 de minute; bolnavul prezintă o veziculă alb-roz, înconjurată de o zonă eritematoasă neregulată, cu caracter edematos. Reacția tardivă apare între 18—24 de ore de la inoculare și se manifestă printr-o papulă și o zonă eritematoasă în jur. Reacția tardivă apare în stadii mai timpurii ale infestației. Diagnosticul bolii se confirmă prin una sau ambele reacții pozitive. Trebuie să se aibă însă în vedere faptul că sensibilitatea cutanată este foarte persistentă și o reacție pozitivă la un moment dat poate să nu aibă nici o legătură cu un episod febril concomitent, ci să fie datorită unei trichinoze mai vechi, cu sau fără manifestări clinice.

Tabloul sanguin. În cursul bolii se instalează o leucocitoză la 10 000—20 000 de elemente/mm^3. Rareori numărul leucocitelor este normal sau scade sub limita normală. Hipereozinofilia este caracteristică bolii. Apare după 7—8 zile de boală, crește în faza a doua a bolii, cînd ajunge la un procent între 20 și 80% și uneori peste 80%. Intensitatea eozinofiliei nu este totdeauna proporțională cu gradul de infestare. În formele grave, eozinofilele scad înainte de moarte. Eozinofilia constituie în diagnosticul trichinozei un element prețios alături de celelalte semne clinice caracteristice. Procentul eozinofilelor descrește lent, revenind la normal după mai mulți ani de la îmbolnăvire.

TRICOCEFALOZA

Trichuris trichiura

Tricocefaloza este o helmintoză foarte răspîndită. Deseori boala este asimptomatică sau oligosimptomatică. În unele cazuri se manifestă printr-o simptomatologie clinică gravă și completă și prin complicații multiple.

Morfologia parazitului. Tricocefalul este un nematod de lungime mijlocie, albicios, cu extremitatea anterioară foarte subțire.

Masculul are 3—4 cm lungime. (Fig. 425 și 426). Corpul prezintă două porțiuni distincte, inegale ca lungime. Porțiunea anterioară este subțire și mai lungă, porțiunea posterioară este mai groasă, mai scurtă și îndoită ca o cîrje. Raportul de lungime dintre cele două porțiuni este de 3/2. Cuticula este fină, îngroșerile longitudinale hipodermice subțiri; musculatura de tip holomiar. Orificiul bucal se situează la extremitatea anterioară și este prevăzut cu trei buze subțiri. Esofagul este de tip strongiloid. Orificiul anal se găsește subterminal, ventral și reprezintă o cloacă. Aparatul reproducător mascul este tubular, unic și alcătuit asemănător cu al oxiurului. Canalul ejaculator se deschide în cloaca comună, care este prevăzută cu un singur spicul lung, retractil și înconjurat de o teacă membranoasă, cu numeroși spini mici.

Femela are 3–5 cm lungime. Porțiunea subțiată a corpului este mai lungă decît la mascul, raportul de lungime față de porțiunea posterioară fiind 2/1. Aparatul reproducător al femelei se găsește în porțiunea mai groasă a corpului și este tubular și unic. Porțiunea inițială a tubului este ovarul, urmează oviductul, uterul și vaginul scurt și subțire. Orificiul vulvar este situat la unirea porțiunii subțiri cu cea groasă a corpului. O parte din vagin poate să prolabeze în exterior prin orificiul vulvar.

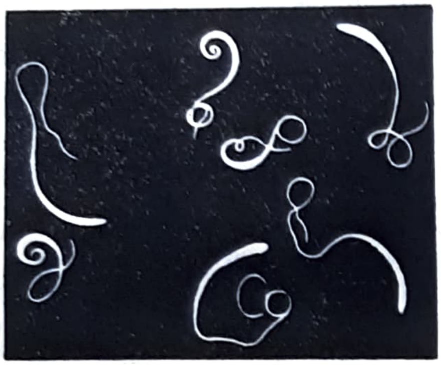


Fig. 425. — Trichuris trichiura. 3 masculi și 4 femele, mărime naturală (din Predtecenski, 1960).

Oul de tricocefal este caracteristic. Are dimensiuni de 50 μ lungime și 22 μ grosime. Forma lui este ovalară, culoarea brună. Datorită celor două proeminențe polare, oul seamănă cu o lămîie. Învelișul oului este gros și perfect neted. La cei doi poli, proeminențele sînt mai transparente, datorită constituției lor albuminoase. În momentul eliminării, oul este neembrionat. În interior se găsesc o masă vitelină, nesegmentată, și celula ou.

Ciclul biologic. Ouăle de tricocefal sînt eliminate în mediul extern o dată cu scaunul omului. Embrionarea are loc, ca și pentru oul de ascarid, în mediul extern, în funcție de temperatură și umezeală. Ouăle neembrionate nu sînt infestante. Capacitatea infestantă apare o dată cu formarea larvei în ou. Ouăle infestante, introduse în intestinul omului, eliberează larvele. Ciclul perienteric lipsește. Potrivit unor cercetări, tricocefalul ar schița un asemenea ciclu, larva introducîndu-se în grosimea peretelui pentru un interval de timp foarte scurt, de cîteva zile, după care va reveni în lumen, adaptîndu-se condițiilor de mediu din intestin. Tricocefalul parcurge intestinul subțire, se localizează în cec. În răstimp de o lună de la infestare, parazitul devine adult, se acuplează, iar femelele încep să depună ouă, care vor fi eliminate cu fecalele din intestinul gazdei.

Rol patogen. Tricocefalul se localizează în cec, apendice și uneori în ileonul terminal. Aici parazitul se înseilează cu partea anterioară subțire în mucoasa intestinală, ajutat de o substanță litică pe care o produce.

Deseori prezența tricocefalului în tubul digestiv al omului trece neobservată. Alteori, fie prin proprietățile lui hematofage, fie prin substanțele toxice sau prin rolul lui iritativ și bacterifer, parazitul poate să fie cauza unor tulburări mai ușoare sau mai grave, în funcție în primul rînd de numărul de paraziți găzduiți în intestin. Pe lîngă tulburările locale privind tubul digestiv, cu manifestări de enterocolită, colici abdominale, apendicită tricocefalică și altele, tricocefaloza poate să fie însoțită de anemii de tip variat. Legătura tricocefalozei cu fenomenele neuropsihice este de asemenea semnalată.

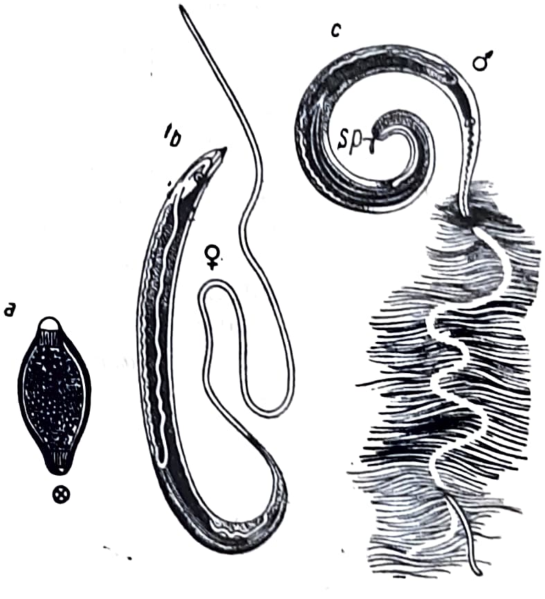


Fig. 426. — Trichuris trichiura.
a – ou; b – femelă (× 3); c – masculul (× 3) înseilat în mucoasa intestinală; sp – spiculul (Brumpt și Neveu-Lemaire, 1951, din Leuckart).

Epidemiologie. Tricocefalul este un geohelmint. Ca și ascaridul, tricocefalul necesită un stagiu în sol sau în apele reziduale, pentru embrionarea ouălor. Durata intervalului de maturare variază de la 2—3 săptămîni la cîteva luni. Ca şi cele de ascarid, ouăle sînt foarte rezistente în mediul extern, păstrîndu-şi multă vreme capacitatea lor infestantă. Măsurile de ordin igienico-sanitar, privind întreruperea căilor de transmitere a ouălor prin mediul extern, sînt de mare importanţă în profilaxia tricocefalozei.

Geografic, tricocefaloza este răspîndită pe tot globul, predominînd în zona temperată şi tropicală. Se pare că, faţă de ascarid, tricocefalul predomină în zonele cu umiditate mai mare. În ţara noastră, tricocefaloza este a doua helmintiază ca incidenţă (9,5 %). Răspîndirea mai mare a bolii este în zonele sudice ale ţării, în Banat şi Muntenia.

Diagnostic de laborator. În mod spontan, paraziţii nu se elimină din organism, sau chiar dacă sînt eliminaţi în diferite condiţii prin scaun, dimensiunile lor mici fac ca să treacă neobservaţi de bolnav.

Diagnosticul bolii se bazează pe examenul coprologic direct şi prin *tehnicile de îmbogăţire* prin flotaţie Willis-Hung sau prin centrifugare Telemann. Ouăle de tricocefal sînt caracteristice şi examinate cu obiectiv 3 şi ocular 10 × se disting uşor prin formă, culoare şi mărime.

Tabloul sanguin arată o diminuare a numărului de hematii, uneori deosebit de intensă, cu poichilocitoză şi modificări ale valorii globulare. În privinţa numărului de leucocite, unii cercetători constată în general o leucopenie. Uneori apare o uşoară leucocitoză. Hipereozinofilia nu este obligatorie şi cifrele găsite oscilează între 4 şi 24 %.

STRONGILOIDOZA

Strongyloides stercoralis

Strongiloidoza sau anghiluloza este boala parazitară datorită infestării cu *S. stercoralis*, manifestată prin tulburări generale şi digestive. Viermele prezintă o alternare de generaţii parazite în organism şi libere în sol.

Morfologia parazitului. *S. stercoralis* este un nematod foarte mic. Formele parazite prezintă unele diferenţe faţă de formele libere.

Forma parazită. Masculul seamănă cu cel al generaţiei libere. Esofagul este de tip strongiloid. Femela are 2,2 mm lungime şi 30—50 μ grosime. Extremitatea anterioară a corpului este mai subţiată. Orificiul bucal este situat terminal anterior şi prezintă buze puţin distincte. Esofagul este lung, de tip strongiloid. Orificiul anal se află subterminal, ventral şi are forma unei fante transversale. Aparatul reproducător este dublu, tubular şi reprezentat prin două ovare care se continuă cu două utere: unul anterior şi unul posterior. Uterele conţin un număr mic de ouă, 5—9, şi se deschid direct în orificiul vulvar, care este situat în treimea posterioară a corpului. *Oul* este ovalar, are 50—58 μ lungime şi 30—34 μ grosime. Coaja este foarte subţire. Oul prezintă în interior larva dezvoltată, cu esofag rabditoid. *Larva rabditoidă* are 200—300 μ lungime şi 14—16 μ grosime. (Fig 427). Esofagul este de tip rabditoid şi prezintă schiţa aparatului reproducător. Larva este foarte vioaie. *Larva strongiloidă* este mai lungă, are 500—600 μ foarte fină. Esofagul este de tip strongiloid.

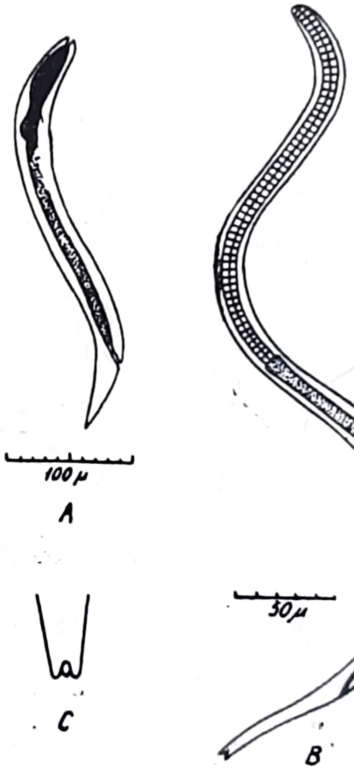


Fig. 427. — Strongyloides stercoralis.
A — larvă rabditoidă; *B* — larvă strongiloidă; *C* — extremitatea posterioară a larvei strongiloide (din Hackett, Buckley, Murgatroyd, 1955).

Apexul extremității posterioare este ușor bifurcat.

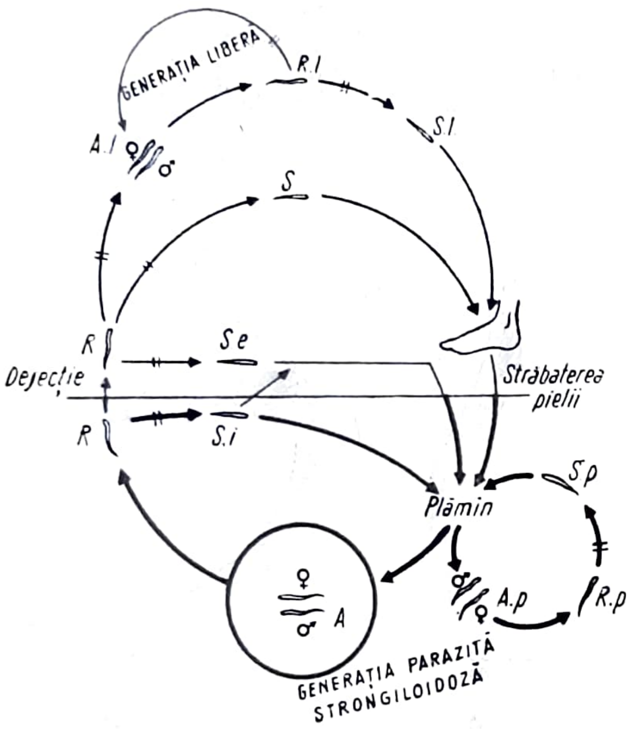


Fig. 428. — *Strongyloides stercoralis*, ciclul biologic, diferitele posibilități evolutive.

A — adulți paraziți în intestin; *R* — larve rabditoide eliminate cu fecalele; *S* — larvă strongiloidă infestantă din larvele rabditoide eliminate ajunse pe sol; *AI* — adulți liberi pe sol; *RI* — larvă rabdiotidă din generația liberă pe sol; *SI* — larvă strongiloidă infestantă din generația liberă pe sol; *Se* — larvă strongiloidă infestantă din larva rabditoidă eliminată cu fecale rămasă pe tegumeetele perineului; *Si* — larvă strongiloidă infestantă din larvele rabditoide din fecale, în intestinul omului; *Ap* — adulți paraziți în plămin; *Rp* — larve rabditoide în plămin din adulți paraziți în plămin; *Sp* — larve strongiloide în plămin → evoluția în ou; → evoluția în mediul extern. –|–→ năpîrlire.

Formele libere. Masculul are 0,7 mm lungime și 36 μ grosime. Extremitatea posterioară este răsucită în formă de cîrjă. Orificiul bucal este terminal, anterior, prevăzut cu trei buze. Esofagul este de tip *rabditoid*, prezentînd deci două dilatații separate între ele printr-o strangulare a esofagului: prima dilatație este alungită, cilindrică; a doua este mai scurtă, piriformă și prezintă o armătură chitinoasă în formă de *Y*. Tubul digestiv și canalul ejaculator se deschid în cloaca comună, situată subterminal și prevăzută cu doi spiculi recurbați. *Femela* are 1 mm lungime și 50 μ grosime. Aparatul reproducător femel este dublu, uterele sînt unul anterior și unul posterior și conțin 30—40 de ouă. Orificiul vulvar este situat ventral și puțin posterior față de mijlocul corpului. *Oul* este ovalar, are 70—75 μ lungime și 45 μ grosime. În interior se observă larva rabditoidă. Uneori larva părăsește cochilia oului chiar în uterul femelei.

Ciclul biologic (Fig. 428). Femela de *S. stercoralis* depune ouă din care ies larve în intestinul omului. Larvele sînt rabditoide. Ele sînt eliminate cu fecalele în mediul extern. Evoluția ulterioară se poate face prin două căi. Larvele rabditoide eliminate se transformă după năpîrlire în larve strongiloide sau filariforme, rezistente în sol și infestante pentru om. Ele pătrund prin tegumentele intacte în organismul omului. Prin vasele sanguine sau străbătînd țesutul conjunctiv, larvele ajung în plămîni, unde evoluează mai departe. Din alveolele pulmonare, parazitul este ridicat prin căile respiratorii pînă în faringe, de unde prin deglutiție ajunge în stomac și intestin. Femelele fecundate se îngroapă în grosimea peretelui intestinal, apoi depun ouă, din care vor ieși larve, și ciclul evolutiv va continua. Din momentul în care omul este infestat de larvele de *S. stercoralis* și pînă la eliminarea larvelor rabditoide cu fecalele trec două săptămîni și jumătate.

În alte împrejurări, larvele eliminate pe sol continuă să crească, năpîrlesc și se transformă în adulți masculi și femele. Aceștia reprezintă formele rabditoide care trăiesc libere pe sol. Din aceste forme libere, în condiții prielnice, pot să evolueze mai multe generații de larve și adulți liberi rabditoizi. În alte condiții, prima generație de larve rabditoide, sau una dintre generațiile următoare se transformă, prin năpîrlire, în larve strongiloide sau filariforme, care sînt infestante pentru om.

S-a descris înmulțirea parazitului în alveola pulmonară, cînd femela fecundată se îngroapă în peretele alveolar și apoi depune ouă. De asemenea s-a descris transformarea larvelor rabditoide în larve strongiloide chiar în intestinul gazdei și deci infestarea omului are loc în astfel de împrejurări, fie direct prin mucoasa intestinală, fie prin suprafața tegumentară perianală; fenomenul a fost descris ca o autoinfestare.

S-a descris în evoluția parazitului și posibilitatea înmulțirii partenogenetice, în cazul intercalării generațiilor libere în sol, cînd din larvele strongiloide infestante ar genera, în organismul omului, numai femele cu proprietăți partenogenetice.

Rol patogen. Strongiloidoza evoluează clinic în patru perioade. Inițial, în perioada de invazie, survin leziuni cutanate datorită pătrunderii active a larvelor prin pielea intactă a omului. În perioada migrației pulmonare, boala poate să evolueze, fie asimptomatic, fie luînd forma unei afecțiuni congestive pulmonare și bronho-pulmonare, uneori cu complicații pleurale. În intestin, parazitul se localizează în duoden și jejun. Strongiloidoza intestinală se manifestă printr-o simptomatologie nespecifică, de tipul unei enterite cu dureri, diaree. Colica intestinală lipsește. În fazele înaintate ale bolii apar fenomene de natură nervoasă și toxică ca anemia, astenia și neurastenia. Gravitatea bolii și formele clinice sînt în general dictate de gradul de infestare, mergînd de la infestații asimptomatice pînă la forme deosebit de grave.

Epidemiologie. Sursa de infestare a strongiloidozei este omul bolnav. Răspîndirea boli este legată de poluarea solului cu fecale prin defecarea direct pe pămînt în condiții neigienice. Calea de pătrundere a larvelor în organism este cutanată (în mod obișnuit, larvele pătrund prin tegumentele piciorului gol) sau digestivă (larvele sînt aduse cu fructele sau zarzavaturile). Strongiloidoza este o boală cu arie de răspîndire mai largă și mai extinsă spre nord, decît anchilostomiaza. Evoluția pe sol a larvelor strongiloide și a generațiilor libere de *S. stercoralis* necesită o temperatură mai joasă (de la 8—15°) decît evoluția larvelor de *Ancylostoma duodenale*. Longevitatea larvelor strongiloide a *S. stercoralis* este însă mai mică decît a *A. duodenale*. În țara noastră, boala este cunoscută de multă vreme.

Diagnostic de laborator. *Examenul coprologic direct* între lamă și lamelă pune în evidență larvele caracteristice rabditoide, cu mișcări vioaie. Erori de diagnostic pot să aibă loc cînd examenul se efectuează după 24 de ore de la emisiunea fecalelor unui purtător de *A. duodenale* sau *Necator americanus*, cînd larvele acestor helminți se liberează din ouă și pot să fie confundate cu larvele de *S. stercoralis*. Deci, o condiție în diagnosticul strongiloidozei este examinarea fecalelor imediat după emisiune.

Concentrarea larvelor de *S. stercoralis* din fecale se poate face prin metoda Baermann, utilizată pentru decelarea larvelor de *Ancylostoma duodenale* din solul infestat. Metoda Baermann se bazează pe termotropismul și higrotropismul pozitiv al larvelor. Aparatul Baermann constă dintr-o pîlnie de sticlă mare, cu diametrul de 12—15 cm, care în partea de jos poartă un robinet sau se unește cu un tub de sticlă printr-un tub de cauciuc pensat. Aparatul conține apă caldă la 40—45° pînă la fundul pîlniei, precum și în tubul anexă. Pîlnia este montată pe un stativ, astfel ca tubul anexat să pătrundă într-un vas cu apă la 40—45°, apă care se schimbă pentru ca temperatura să rămînă constantă în timpul desfășurării metodei de concentrare. Fecalele de cercetat (10 g sau mai mult) se așază pe un strat de tifon peste o sită, înăuntrul pîlniei de sticlă (fig. 428 bis). Larvele sînt atrase din fecale în apă prin mecanismul tropismelor amintite. După 1—3 ore, conținutul din partea de jos a pîlniei (5—10 ml) se recoltează și se centrifughează 1—2 minute cu viteză mică. Din sedimentul după centrifugare se ia cu o pipetă și se examinează cu lupa într-o sticlă de ceas sau cu microscopul cu un sistem de mărire scăzut, între lamă și lamelă.

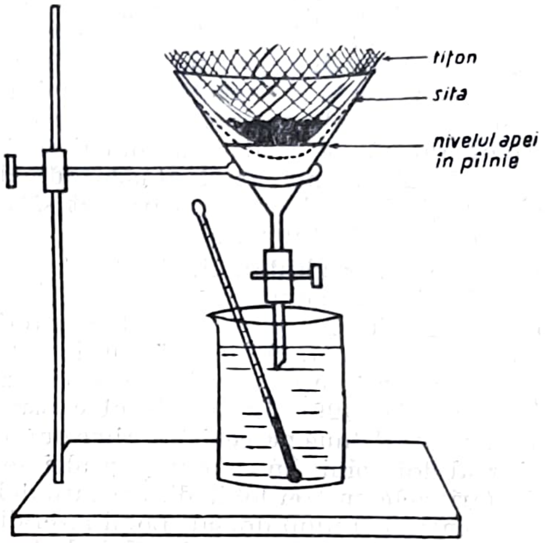


Fig. 428 bis. — Aparatul Baermann.

Culturi de generații libere în scop diagnostic pot să fie obținute amestecînd în părți egale fecale cu praf de cărbune. Cultura are avantajul că îmbogățește numărul de nematode.

Examenul lichidului extras prin *sondaj duodenal* pune în evidență larvele. Sondajul este indicat pentru precizarea diagnosticului, deoarece *S. stercoralis* este singurul nematod ale cărui larve se găsesc libere în tubul digestiv al omului.

Tabloul sanguin arată o scădere numerică a hematiilor. În formula leucocitară eozinofilele sînt constant crescute. Maximul curbei eozinofilelor se instalează probabil către a 40-a zi de la infestare, cînd atinge cifra de 60-80%. Ulterior procentul scade, menţinîndu-se timp îndelungat la un nivel ridicat.

ANCHILOSTOMOZA

Ancylostoma duodenale

Anchilostomoza (anchilostomiaza) este o boală datorită prezenţei în organismul omului a nematodului *A. duodenale*. Anchilostomoza este caracteristică zonelor calde de pe glob, deoarece evoluţia larvelor în sol necesită o anumită temperatură. În zonele temperate, aceste condiţii de temperatură se realizează numai în locuri închise şi calde, cum ar fi minele adînci, cărămidării şi altele, locuri în care pot să apară focare de anchilostomoză.

Morfologia parazitului. *A. duodenale* este un nematod mic. Masculul are 0,8—1 cm lungime şi 0,4 mm grosime. La extremitatea anterioară are o *capsulă bucală*, chitinoasă, cu deschiderea ovalară întoarsă uşor spre partea dorsală a viermelui (Fig. 429). În interiorul capsulei se observă ventral două perechi de cîrlige puternice, iar dorsal doi spini. În centrul capsulei se deschide faringele cu trei lobi, dintre care doi sînt latero-ventrali şi unul dorsal. Lobii laterali prezintă cîte o lamă tăioasă, iar lobul dorsal o formaţiune de întărire a capsulei bucale. Esofagul este de tip strongiloid. Aparatul reproducător este tubular. Masculul are o *pungă copulatoare* caracteristică, situată la extremitatea posterioară a corpului. Punga copulatoare, de natură chitinoasă, are patru lobi întăriţi prin coaste chitinoase caracteristice ca dispoziţie. În punga copulatoare se află orificiul cloacal prevăzut cu doi spiculi lungi.

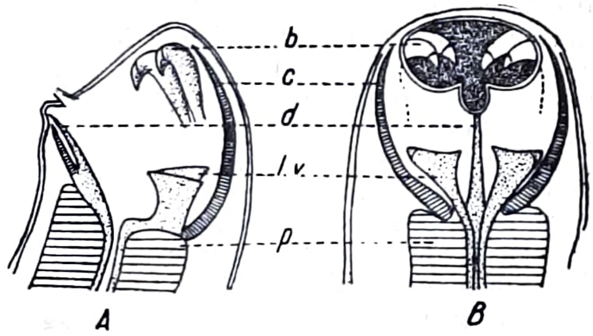


Fig. 429. — Ancylostoma duodenale. Capsula bucală.
A — profil; *B* — văzut pe faţa dorsală: *b* — cîrligele ventrale: *c* — scheletul capsulei bucale; *d* — dinţi faringieni dorsali; *lv* — lame faringiene latero-ventrale; *p* — faringe (din Brumpt şi Nevou-Lemaire, 1951).

În momentul acuplării, punga copulatoare fixează masculul de femelă. *A. duodenale* are, trei glande distincte: glandele cefalice, care se deschid în capsula bucală, glandele cervicale care se deschid la porul excretor situat ventral şi glandele anale, care îşi varsă secreţia în cloacă. *Femela* are 1,2—1,5 cm lungime şi o grosime de 0,6 mm. Se deosebeşte net de oxiur prin faptul că nu are extremitatea posterioară atît de subţiată şi ascuţită. Capsula bucală este identică cu a masculului. Aparatul reproducător este dublu, tubular, alcătuit din cîte două ovare, oviducte, utere şi un vagin unic, care se deschide în orificiul vulvar situat în treimea posterioară a corpului.

Oul este ovalar, are 52—61 μ lungime şi 32—40 μ grosime. Oul este simetric, transparent, cu o coajă foarte subţire şi netedă. La emisiune, ouăle prezintă în interior 2—4 sau 8 blastomere.

Ciclul biologic. (Fig. 430). Femela depune zilnic un număr de cîteva mii de ouă. Evoluţia oului şi a larvelor în sol este în funcţie de condiţiile mediului fizic înconjurător: temperatură, umiditate, oxigen, obscuritate, şi pH solului. Oul se embrionează în mediul extern, în 24 de ore. Larva părăseşte imediat oul. Această larvă măsoară 200 μ şi are esofagul de tip rabditoid (Fig. 431). După trei-patru zile, larva năpîrleşte şi se transformă în larvă de al doilea stadiu, prezentînd esofagul de tip strongiloid. După alte două zile are loc o nouă năpîrlire, dar larva îşi păstrează în jurul ei cămaşa de năpîrlire, devenind larvă de stadiul trei, cu esofag de tip strongiloid şi cu proprietăţi infestante pentru om; este aşa-numita larvă strongiloidă închistată, care măsoară 500—600 μ. Larva este foarte rezistentă la condiţiile mediului înconjurător, poate să trăiască cîteva luni şi are numeroase tropisme caracteristice: tinde să se ridice pe suport (geotropism negativ), fiind atrasă de căldură, de umezeală, de corpul omenesc şi de alte larve cu care se încolăceşte (termotropism, higrotropism, histotropism, toate pozitive). Ajunsă în contact cu pielea omului, larva va pătrunde activ în corp, părăsind cămaşa de năpîrlire şi migrează prin corp (ciclul perienteric), trecînd prin plămîn, asemănător cu *S. stercoralis*. După desăvîrşirea acestui ciclu, care durează în medie 10—12 zile, larvele coboară prin tractul digestiv, se localizează în duoden şi jejunul incipient şi se transformă în adulţi. Adulţii sînt hematofagi. După aproximativ 40—50 de zile, femela depune ouă în lumenul intestinal, ciclul biologic continuînd.

Rol patogen. Anchilostomoza este o boală gravă. Evoluția bolii recunoaște în general patru stadii distincte. *Gurma cutanată* este afecțiunea provocată de pătrunderea larvelor prin piele și se manifestă prin eritem și prurit. Reinfecțiile măresc sensibilitatea cutanată, astfel că de fiecare dată gurma îmbracă un caracter mai violent. *Catarul gurmelor* este sindromul pulmonar. Drumul larvelor prin plămîni este mut din punct de vedere clinic, fără febră, eozinofilie sau semne radiologice. Iritația căilor respiratorii superioare duce la catarul propriu-zis, cu tulburări bronșice și faringiene, care durează pînă la trei săptămîni. *Anchilostomoza acută* în sensul strict este o duodenită care debutează în 15–40 de zile de la infestare. Bolnavul prezintă febră, dureri abdominale, diaree și semne radiologice caracteristice. Concomitent se instalează anemia și crește numărul de eozinofile. *Anchilostomoza cronică* se caracterizează printr-o stare toxică, manifestată prin anemie, slăbire accentuată, uneori hepatomegalie cu ascită.

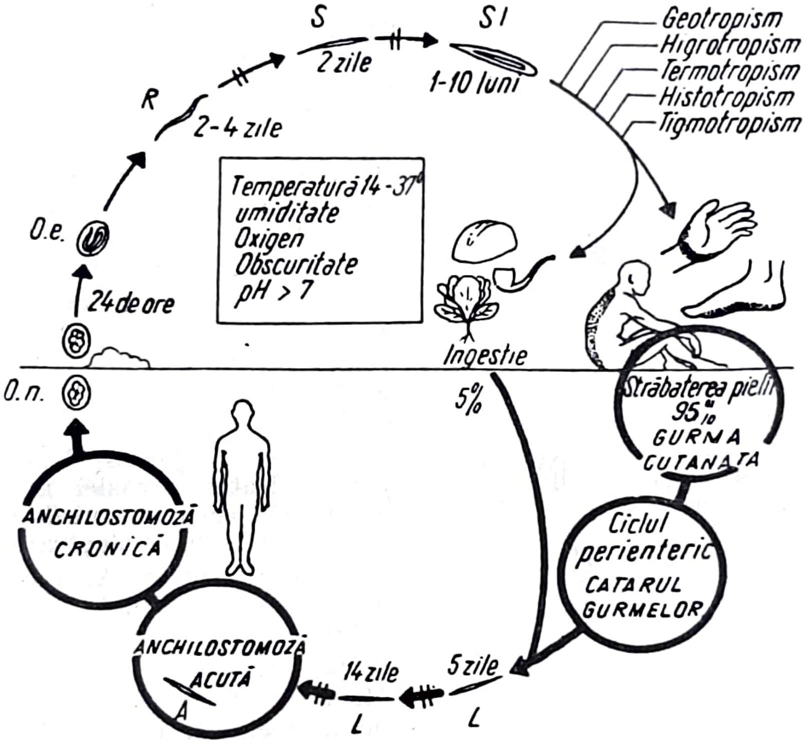

S
SI
2 zile
1-10 luni
Geotropism
Higrotropism
Termotropism
Histotropism
Tigmotropism
R
2-4 zile
Temperatură 14-37°
umiditate
Oxigen
Obscuritate
pH > 7
O.e.
24 de ore
O.n.
Ingestie
5%
Străbaterea pielii
95%
GURMA CUTANATĂ
Ciclul perienteric
CATARUL GURMELOR
ANCHILOSTOMOZĂ CRONICĂ
ANCHILOSTOMOZĂ ACUTĂ
A
14 zile
5 zile
L
L

Fig. 430. — Ancylostoma duodenale. Ciclul biologic.

On – ou neembrionat; *Oe* – ou embrionat; *R* – larvă rabditoidă; *S* – larvă strongiloidă; *SI* – larvă strongiloidă infestantă; *L* – larve în intestinul uman după trecerea prin plămîn; A – adult. → evoluția în ou. ⇸ evoluția în mediul extern. =/⇒ năpîrlire.

Epidemiologie. Sursa de infestare este reprezentată de omul bolnav și purtătorul inaparent, cu un număr mare de paraziți. Calea de transmitere a bolii este reprezentată de sol; condițiile de igienă a îndepărtării fecalelor reprezintă un factor de primă importanță în anchilostomoză. Fecalele împrăștiate la întîmplare vor polua solul și vor contribui la întreținerea infestărilor. Larvele închistate infestante sînt rezistente. Lupta împotriva lor cu substanțe antiseptice cunoscute sau cu sare (clorură de sodiu) nu poate să fie realizată decît pe suprafețe limitate.

La fel de important este să se cunoască cu precizie condițiile în care se infestează omul. În țările tropicale, pielea piciorului gol este poarta de intrare obișnuită a larvelor în organism.

În focarele subterane din zonele temperate, în galeriile minelor de cărbuni, larvele pătrund prin pielea mîinilor și picioarelor, prin spatele rezemat de peretele pe care se urcă larvele și pe calea digestivă, o dată cu alimentele sau apa poluată cu larve.

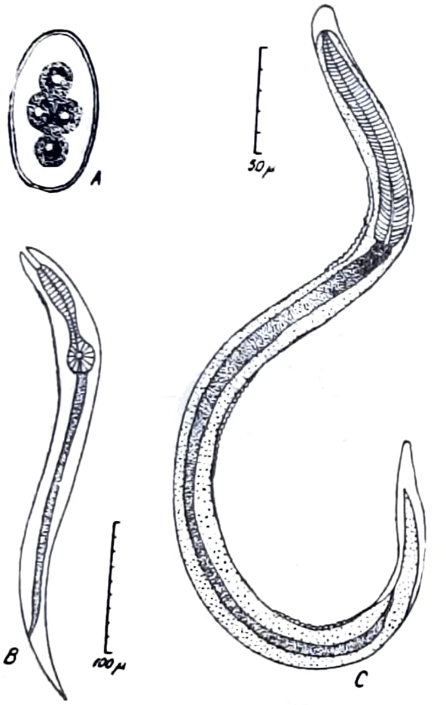


Fig. 431. — Ancylostoma duodenale.
A – ou; *B* – larvă rabditoidă; *C* – larvă strongiloidă.

În țara noastră a existat un singur focar în complexul carbonifer Anina-Steierdorf. Focarul studiat din 1943 de Lupașcu, Cadariu și colaboratorii este astăzi în curs de eradicare. Cazuri izolate de anchilostomoză au fost semnalate și în alte mine din țară. Măsurile igienico-sanitare de asanare a solului, ca scăderea temperaturii prin îmbunătățirea aerajului minier, scăderea umidității prin sisteme de drenare, prevenirea poluării solului, educație sanitară și altele, în paralel cu tratarea sistematică a tuturor cazurilor, au dus la stingerea focarului subteran de anchilostomoză de la Anina (Lupașcu, Agavriloaei și colaboratorii, 1959). În afară de focarul de anchilostomoză din Banat, în țara noastră au mai existat cîteva cazuri izolate de anchilostomoză (Lupașcu, Ungureanu, Nițulescu și colaboratorii, 1960).

Diagnosticul de laborator. *Examenul coprologic direct* și prin *metoda de îmbogățire Willis* pune în evidență oul de anchilostoma. Identificarea ouălor nu comportă dificultăți, dar erori de diagnostic sînt deseori întîlnite. Excepțional pot să fie întîlnite în scaun ouă de *S. stercoralis* neeclozate, care se aseamănă mult cu cele de *A. duodenale*. Deseori se întîmplă însă ca un examen coprologic dintr-un material cu ouă de anchilostoma să fie efectuat după 24 de ore, cînd larvele eclozează din ou, ceea ce poate să ne ducă pe calea greșită a unui diagnostic de strongiloidoză. Este deci necesar ca examenul să fie făcut imediat după emisiunea fecalelor. Deosebirea ouălor de *A. duodenale* și *Necator americanus* nu se poate face în practica curentă de laborator. Uneori se pot întîlni în fecale ouă de *Trichostrongylus colubriformis*, care seamănă mult cu ouăle de *A. duodenale*. Oul de trichostrongil este însă mai mare, mai alungit, cu contur mai neregulat și extremitățile mai ascuțite. În ou, la emisiune, există mai multe blastomere sau chiar o morulă. Oul evoluează repede, în 24 de ore formîndu-se în interior o larvă groasă.

Intensitatea invaziei în anchilostomoză se apreciază prin numărul de ouă pe un preparat prin metoda de concentrare.

Tabloul sanguin. Anemia în anchilostomoză este obișnuită. Anemia poate să îmbrace aspectul ușor și trecător sau poate să ia forme grave de anemie hipercromă sau mai ales hipocromă. Hematiile pot să scadă chiar sub 1 milion, cu anizocitoză, poichilozitoză, policromatofilie și foarte rar cu eritroblaști în sîngele periferic. Numărul de leucocite crește. Leucocitoza este însoțită de polinucleoză cu eozinofile și neutrofile. Numărul eozinofilelor începe să crească după faza pulmonară către ziua a 20-a de la infestare. În faza acută a bolii, numărul lor ajunge la 10–15%, putînd să atingă uneori 50–70%, ceea ce reprezintă maximum, după care încep să scadă. În formele cronice de boală nu se mai observă hipereozinofilia.

Necator americanus

Rolul patogen al nematodului *N. americanus* este asemănător cu al *A. duodenale*. Necatoroza este răspîndită în America, Africa și Asia.

Femela are 7–13 mm lungime; masculul 5–10 mm. Capsula bucală nu are cîrlige. Oul este foarte asemănător cu cel de *A. duodenale*; măsoară 70 μ lungime și 40 μ diametru. Ciclul evolutiv al parazitului și caracterele epidemiologice ale bolii sînt asemănătoare cu ale *A. duodenale*.

PSEUDOMIAZA

Pseudomiaza (dermatita rampantă) este o afecţiune datorită pătrunderii în organism a larvelor de *Ancylostoma brasiliense* sau *A. caninum*. Boala se caracterizează clinic prin traiecte sinuoase roşii şi pruriginoase, pe piele. Biopsia practicată la capătul progresiv al traiectului pune în evidenţă larvele. În ţara noastră, Ungureanu şi colaboratorii (1950) au diagnosticat un caz de pseudomiază cu *A. caninum*. Parazitul afectează obişnuit cîinele şi pisica. Accidental larvele infestate pătrund în corpul omenesc prin piele.

Trichostrongylus sp.

Trichostrongylus este un parazit al tubului digestiv al ierbivorelor. Accidental, viermele poate să paraziteze omul, localizîndu-se în duoden şi jejun. Cînd numărul de paraziţi este mare, boala se manifestă printr-o anemie secundară destul de severă. Ciclul biologic al parazitului este asemănător cu al anchilostomei.

Femela măsoară 5—6 mm lungime şi 80 μ grosime. Masculul este mai mic, cu lungimea de 4—5,5 mm. Bursa copulatoare este bilobată. Oul este ovalar, alungit, măsoară 73—80 μ lungime şi 40—43 μ grosime, are coaja subţire, este transparent şi prezintă de obicei în interior o morulă. În condiţii favorabile, oul se embrionează repede şi în 24 de ore larva părăseşte cochilia oului. Larvele au 480 μ lungime. Recunoaşterea ouălor de *Trichostrongylus* este importantă pentru ca să se diferenţieze de cele de *A. duodenale* cu care se aseamănă. În ţara noastră, primele cazuri la om au fost diagnosticate în regiunea Timişoara. (Costin, Băcilă, Arghiropol, 1956).

OXIUROZA

Enterobius vermicularis

Oxiuroza sau enterobioza este o parazitoză cu *E. vermicularis*. Boala este foarte răspîndită în special la copii şi se caracterizează prin autoinfestare şi infestare directă continuă a celor din jur, fapte care determină aspectul cronic, rebel la tratament, al oxiurozei. În epidemiologia bolii, condiţiile de igienă personală ocupă primul loc.

Morfologia parazitului. *E. vermicularis* este un nematod mic. *Masculul* are 0,3—0,5 cm lungime. Grosimea lui este uniformă în tot lungul corpului. Extremitatea anterioară are un buton cefalic mic, care se dilată şi se retrage şi are funcţia să fixeze parazitul în intestin. Extremitatea posterioară este recurbată în formă de cîrjă. Cuticula are două îngroşări longitudinale ca două creste, care proemină spre exterior. Musculatura este de tip meromiar. Orificiul bucal este situat terminal anterior şi are trei buze retractile. Esofagul este de tip rabditoid. Orificiul anal se deschide în cloacă. Aparatul reproducător mascul este tubular şi alcătuit din testicul, canal deferent, veziculă seminală şi canal ejaculator. Ultimul se deschide în cloacă. Acest orificiu este situat subterminal ventral şi are un singur spicul recurbat.

Femela are 1—1,5 cm lungime (Fig. 432 şi 433). Extremitatea posterioară este foarte ascuţită, subţire şi dreaptă. Orificiul anal este situat ventral la locul unde începe partea posterioară subţire a corpului. Aparatul reproducător al femelei este tubular, dublu şi se compune din ovare, unul anterior, altul posterior, inegale ca lungime, oviducte, utere groase care se unesc în uterul comun şi un vagin subţire şi scurt. Orificiul vulvar este ventral, în treimea anterioară a corpului.

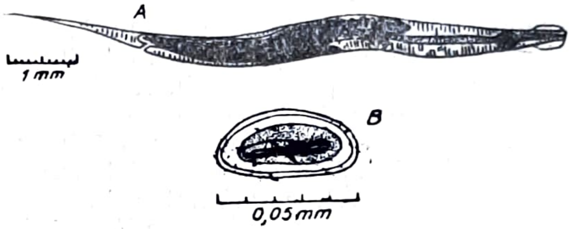


Fig. 432. — Enterobius vermicularis.
A — femelă; *B* — ouă (*A.* din Hackett, Buckley, Murgatroyd, 1955).

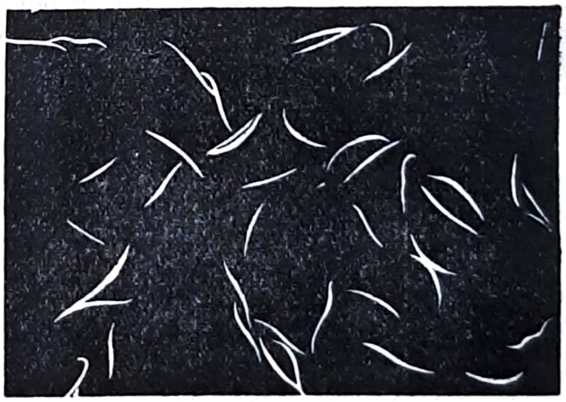


Fig. 433. — Enterobius vermicularis (din Predtecenski, 1960).

Oul este ovalar şi asimetric, cu o faţă plană şi una bombată, ceea ce îi dă aspectul plan-convex. Are lungimea 50—55 μ şi grosimea 20—25 μ. Culoarea este alb-cenuşie. Oul este transparent şi are un înveliş neted, subţire, liniar, format din două membrane suprapuse. Membranele sînt lipite într-un singur loc, aproape de unul din poli. Ouăle depuse de femelă sînt embrionate. Embrionul are o formă caracteristică, cu o parte ovală, mare și una subțire, ca o codiță recurbată. Embrionul, datorită asemănării cu un mormoloc de broască, a primit numele de *embrion giriniform*. Ulterior, embrionul giriniform se transformă într-o larvă vermiformă, lungă de 140 μ și îndoită de trei ori în interiorul oului.

Ciclul biologic. Oxiurul este singurul nematod care nu depune ouăle pe rînd, unul cîte unul. Ouăle, în număr de cîteva mii, rămîn în uter, unde se embrionează. Femela migrează din cec spre anus și depune toate ouăle odată în cutele anusului și în jur. Într-un interval foarte scurt (pînă la cîteva ore), embrionul giriniform din ou se transformă în larvă vermiformă infestantă. Ouăle ajunse pe o cale oarecare în tubul digestiv eliberează larvele. Năpîrlirea larvelor are loc în intestinul subțire. Adulții se acuplează în ileon și trec în colon. Masculii sînt expulzați imediat; femelele rămîn în cec pînă la dezvoltarea ouălor, mergînd apoi spre anus pentru depunerea ouălor.

În afară de acest ciclu, oxiurul se pare că poate să evolueze și pe alte căi. Astfel, potrivit teoriei autoinfestării interne, femela de oxiur pătrunde în peretele intestinal, unde depune ouăle. Larvele eclozate pe loc vor invada lumenul intestinal, evoluînd spre adulți. Potrivit teoriei retroinfecției, larvele eclozate în regiunea perianală ar pătrunde prin orificiul anal și ar urca activ prin tubul digestiv, pînă la locul unde își vor continua evoluția și vor deveni adulți. Pentru această ultimă ipoteză pledează prezența ouălor goale, fără larve, în regiunea perianală. Se pare însă că este necesar ca ouăle să pătrundă în tubul digestiv pe cale orală, pentru ca să fie supuse acțiunii sucurilor digestive intestinale.

Rolul patogen al oxiurului este foarte variat. Sînt cunoscute cazuri inaparente, după cum uneori apar accidente febrile grave. Fenomenele locale, extrem de variate, prodomină în oxiuroză. În intestin, oxiurul poate să provoace enterocolite, prin acțiunea lui iritantă locală excitînd zone reflexogene din cec și rect sau prin infecții secundare cu floră intestinală. Apendicita cu oxiuri este o afecțiune cunoscută de multă vreme. Oxiurul poate să migreze anormal în căile biliare și pancreatice. Un fenomen local important în oxiuroză este iritația pruriginoasă a regiunii perianale, manifestată prin prurit intens, congestie perianală și uneori placarde exematiforme întinse. Vulvo-vaginita la fetițe cu oxiuri este datorită de obicei iritației directe a oxiurilor femele ajunse în regiunea genitală. Pe plan general, oxiuroza se manifestă prin tulburări nervoase și toxice.

Epidemiologie. Sursa de infestare este omul bolnav. În transmiterea bolii, rolul cel mai important îl joacă mîinile murdare ale bolnavului. Cercetări în acest sens au dovedit că 60—70% dintre copiii bolnavi au sub unghii ouă de oxiuri, mai ales la mîna dreaptă, ca urmare a scărpinatului în regiunea perianală. Indirect, ouăle de oxiur se transmit prin lenjerie, jucării, obiecte de toaletă, alimente. La distanță, ouăle se transmit prin muște și prin praf. Este cunoscut faptul că ouăle rezistă mult timp, mai ales în praful din interiorul locuinței, pe obiecte, pe podea și pe pervazul ferestrelor. Oxiuroza este o boală care se transmite ușor în colectivități de copii și în familie. Examinarea conținutului de sub unghii la cei sănătoși din jurul unui copil bolnav de oxiuroză arată prezența ouălor în mediul înconjurător. Oxiuroza este o boală cronică, greu de combătut, deoarece infestările și reinfestările bolnavului și celor din jurul său întrețin permanent sursa de boală, în împrejurări în care normele de igienă individuală nu sînt respectate.

Oxiuroza este răspîndită pe tot globul. Conform unor aprecieri cifra celor infestați se ridică la peste 200 000 000. Statistici pe anumite loturi, în special copii, arată în Europa centrală și de apus o infestare între 60 și 100%.

În țara noastră, oxiuroza ocupă statistic locul al treilea între helmintoze. Incidența globală a bolii este 4,5%. Lupașcu, Ungureanu, Nițulescu și colaboratorii (1960) consideră acest procent mult sub nivelul real, bazîndu-se pe sondaje în sînul populației, efectuate cu metoda specială pentru diagnosticul oxiurozei cu ajutorul baghetei cu celofan.

Diagnosticul de laborator al oxiurozei. Prin *examenul macroscopic* se identifică parazitul pe baza dimensiunilor și aspectului femelei. Diagnosticul este ușurat de faptul că bolnavul recoltează parazitul, eliminat prin anus, o dată cu scaunul sau în afara acestuia.

Examenul coprologic direct sau prin *metoda de concentrare Willis* dă rezultate slabe în oxiuroză. Ouăle nu se identifică în fecale decît într-un procent de aproximativ 5% la bolnavi. Faptul că în scaun ouăle se găsesc atît de rar, se explică prin particularitatea oxiurului de a depune ouăle nu în interiorul intestinului, ci în regiunea anală. În momentul emisiunii, fecalele pot să se contamineze cu oul.

Metoda prelevării ouălor din regiunea perianală este specială pentru diagnosticul oxiurozei. Recoltarea materialului de examinat se face cu ajutorul unei baghete (Fig. 434). Metoda NIH indică folosirea unei baghete de sticlă de 10—15 cm, cu un diametru de 4 mm, rotunjită la capete. Una dintre extremități se învelește într-o bucată de celofan pătrată, cu latura de 2,5 cm. Este mai bine ca bucata de celofan să fie tăiată în forma unei șuvițe late de 0,5—0,7 mm și lungă de 6 cm și să fie așezată la capătul baghetei de o parte și de alta, fixîndu-se cu un inelus de cauciuc tăiat dintr-un tub. Bagheta se fixează într-un dop de plută sau de vată și se introduce într-o eprubetă fără să atingă fundul eprubetei. Recoltarea se face introducînd în anus 0,5 cm din vîrful baghetei și rotînd pentru desfacerea și ștergerea cutelor anale. Bagheta se reintroduce în eprubeta cu numărul corespunzător.

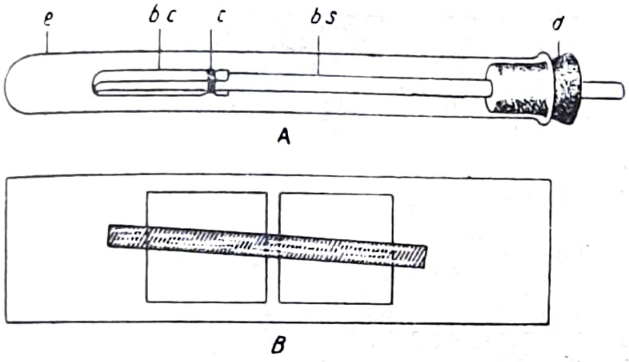


Fig. 434. — Bagheta pentru recoltarea ouălor de oxiuri.
A – material de recoltare: *B* – bandă de celofan întinsă pe lamă: e – eprubetă; *b. c* – bandă de celofan; *ic* – inelus de cauciuc; *b.s* – baghetă de sticlă; *d* – dop.

În laborator se ridică inelușul de cauciuc deasupra benzii de celofan, iar banda se pune pe o lamă cu două picături de ser fiziologic și se acoperă cu două lamele. Se examinează la microscop cu obiectiv 3 și 7. Ouăle de oxiur se identifică cu ușurință și nu pot să fie confundate cu alte ouă de paraziți. Confundarea ouălelor de oxiur cu cele de dicrocel se exclude, deoarece ultimele ouă, deși sînt tot plan convexe, au însă culoarea brună și prezintă un opercul mare.

Metoda NIH a fost modificată de Nițulescu (1948) prin înlocuirea celofanului cu o peliculă formată prin înmuierea vîrfului baghetei în soluție de colodiu. După recoltare, pelicula se desprinde de baghetă cu un bisturiu și se examinează între lamă și lamelă conform tehnicii de mai sus.

S-a experimentat prelevarea ouălelor din regiunea perianală cu benzi adezive, care apoi se lipesc de o lamă de sticlă. Metoda aceasta ar fi mai simplă și mai practică decît cea cu bagheta cu celofan (Ungureanu și Boingeanu-Dranga, 1954) în privința manipulării și a transportului pe teren.

Examenul de cercetare a ouălor de oxiuri trebuie să se repete de patru ori, la 10, 20 și 30 de zile, în cazuri suspecte, în examenul în masă și în controlul după tratament.

Ocazional, la fetițe, paraziți și ouă pot să fie antrenați în urină și se decelează în sediment.

Metodele de cercetare imunobiologică în oxiuroză nu dau rezultate specifice.

Tabloul sanguin nu este caracteristic. Bolnavii prezintă o scădere a numărului hematiilor, uneori destul de marcată. Hipereozinofilia este inconstantă, apărînd potrivit părerii unor autori, numai la 11% din bolnavi. De fapt, eozinofilele cresc din ziua a 8-a de la infestare, ating un maxim către ziua a 28-a, iar apoi scad. În perioada de maximum, eozinofilele nu depășesc 20 — 28% leucocite, situîndu-se deci la un nivel inferior față de alte helmintoze.

ASCARIDIOZA

Ascaris lumbricoides

Ascaridioza, una dintre cele mai răspîndite helmintoze ale omului, este datorită ciclului perienteric și localizării intestinale a nematodului *Ascaris lumbricoides*. Boala are manifestări multiple, nespecifice, subclinice în general, apare mai ales la vîrste mici, este legată de anumite condiții igienice și are o largă răspîndire pe tot globul pămîntesc.

Morfologia parazitului. *A. lumbricoides* este cel mai mare nematod intestinal al omului (Fig. 435). *Masculul* are 15 — 17 cm lungime și 0,5 cm grosime. Culoarea este albă, capetele ascuțite. Extremitatea posterioară este răsucită în formă de cîrjă și prezintă doi spiculi subțiri recurbați. Peretele corpului este format din trei pături concentrice: cuticula, hipodermul, cu cele patru îngroșări longitudinale bine dezvoltate și musculatura, de tip polimiar. Orificiul bucal este anterior și are trei este în întregime plin cu substanță vitelină, fără să mai lase spații libere între conținut și coajă.

Oul embrionat format în mediul extern prezintă o larvă cilindrică, răsucită în formă de 8, lungă de aproximativ 250 μ și prevăzută cu un pinten cefalic chitinos.

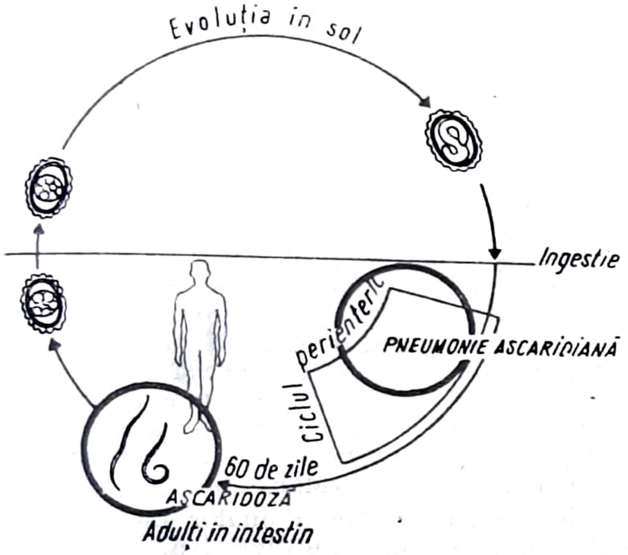


Fig. 437. — Ascaris lumbricoides. Ciclul evolutiv.

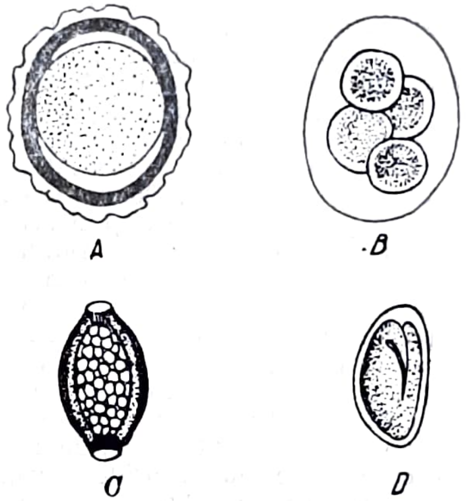


Fig. 438. — Ou de nematode.
A — Ascaris lumbricoides; B — Ancylostoma duodenale; C — Trichuris trichiura; D — Enterobius vermicularis.

Ciclul biologic (Fig. 437). Femela de ascarid depune zilnic un număr foarte mare de ouă. Vasilkova consideră că acest număr depășește cifra de 200 000 pentru o femelă. Embrionarea ouălelor are loc în mediul extern, în funcție de temperatură și umiditate. Cercetătorii sovietici Vasilkova și Pavlovski au arătat în detaliu importanța temperaturii asupra viabilității și embrionării oului de ascarid în mediu extern. Embrionul se formează în 10 — 40 de zile. El năpîrlește în interiorul oului, devenind infestant pentru om (Fig. 438). Oul infestant, ingerat de om, își pierde învelișurile, liberînd larva în intestinul gazdei sub influența temperaturii, presiunii și chimismului local. Nefiind adaptată la condițiile mediului intestinal, larva de ascarid va parcurge un circuit parenteral sau perienteric complicat. Larva străbate peretele intestinal și pe calea venei porte ajunge în ficat, unde face un popas de cîteva zile, în care timp se dezvoltă, ajungînd la dimensiunea de 400 μ. Larva își continuă apoi drumul prin căile venoase suprahepatice, trece prin inimă, ajunge în mica circulație și se oprește în plămîn, în capilarele alveolare, unde va face un al doilea popas de 5 — 7 zile. În acest interval, larva ajunge la lungimea de 1 mm. Ulterior larva străbate peretele alveolar, cade în alveolă și este purtată prin bronhiole, bronhii, trahee, laringe, de unde pătrunde în faringe și coboară spre intestine. Ajunse în intestin, larvele de ascarid se dezvoltă, devin adulți; aceștia se acuplează și după un interval de două luni de la ajungerea în intestin a larvelor, femelele adulte vor depune ouă. Ciclul biologic va continua astfel o dată cu eliminarea prin scaun a ouălor fecundate.

În afară de tipul migrator parenteral descris mai sus, Skriabin a arătat că larvele de ascarid pot să urmeze căi facultative, ca cea limfo-pulmoenterală, fără să mai treacă prin ficat. În plus există și tipuri de migrație anormală în diferite organe, unde larvele se închistează. Acest tip de migrație reprezintă o cale închisă. Dintre larvele care au parcurs un drum normal în organismul omului o parte nu se vor reîntoarce în intestin, ci vor fi expulzate o dată cu expectorația.

Rol patogen. *A. lumbricoides* determină în organismul omului un șir de fenomene clinice care încep încă din faza ciclului perienteric al parazitului. Trecerea larvelor prin plămîn se manifestă clinic prin *pneumonia ascaridiană*, a cărei gravitate este în funcție de masivitatea infestării. În această fază a bolii apar infiltrate pulmonare labile, întovărăşite de febră moderată tulburări respiratorii şi hipereozinofilie (sindromul Löffler). O altă manifestare clinică apare în cursul ciclului migrator anormal, cînd larvele pot să se închisteze în diferite organe, dînd naştere la granuloame cu eozinofilie. Fenomenul este datorit în special infestărilor accidentale cu *Toxocara canis* şi *T. cati*. Tulburările provocate de localizarea definitivă a parazitului în intestin sînt variate şi se datoresc acţiunii mecanice iritative toxice, bacterifere, precum şi eratismului viermelui în anumite condiţii. Simptomatologia digestivă este variată, nespecifică şi în general discretă. Colica ascaridiană, tulburările dispeptice, alergice şi nervoase însoţesc uneori boala. Eratismul ascaridului poate să determine complicaţii grave cînd nematodul se angajează în canalele marilor glande digestive sau perforează peretele intestinal. Ascarizii angajaţi ascendent pe tubul digestiv pot să pătrundă în căile respiratorii sau pot să fie eliminaţi prin vărsătură. De o deosebită importanţă sînt complicaţiile ascaridiene mecanice determinate de intervenţiile chirurgicale asupra tubului digestiv. Autorii sovietici recomandă dehelmintizarea obligatorie în faza de pregătire preoperatorie a bolnavului.

Epidemiologie. Ascaridul face parte dintre *geohelminţi*. Ouăle eliminate cu fecalele din intestinul uman nu sînt infestante imediat, ci doar după o perioadă de evoluţie care are loc în sol.

Pentru maturarea ouălor sînt de mare importanţă condiţiile de mediu fizic extern. Şcoala sovietică de helmintologie, în frunte cu acad. K. I. Skriabin, a studiat în profunzime această problemă. Maturarea ouălor are loc în condiţii optime la temperaturi între 20 şi 24° şi umiditate 60%. În privinţa gradului de oxigenare a mediului, cercetări efectuate de Sorescu, Panaitescu şi Ciurea (1958) au demonstrat posibilitatea evoluţiei ouălor de *A. lumbricoides* sub limitele clasic admise, observînd în acelaşi timp o prelungire a perioadei de maturare a ouălor, în raport cu scăderea concentraţiei de oxigen în mediu. Lupaşcu şi colaboratorii (1959) au demonstrat evoluţia embrionară lentă în condiţii de anaerobioză din mîlul bazinelor de decantare a apelor. Cercetările romîneşti sînt cu atît mai importante, cu cît încă mai de mult cercetătoarea sovietică Usaciova a arătat că sedimentul din fundul bazinelor apelor curgătoare poluate constituie principalul rezervor în care se concentrează ouăle de geohelminţi şi din care are loc ulterior o infestare secundară a apelor cu ouă maturate în aceste sedimente.

Condiţiile de igienă în care se efectuează îndepărtarea reziduurilor fecaloid-menajere şi utilizarea apelor poluate sînt elemente de primă importanţă în epidemiologia ascaridiozei. Reziduurile lichide şi lichefiabile eliminate din centrele populate poluează apele curgătoare. Folosirea acestor ape fără o prelucrare sanitară prealabilă pentru grădinile de zarzavat sau fără să se ia măsuri de protecţie a culturilor vor duce la helmintizarea zarzavaturilor. Gromaşevski a arătat, de multă vreme importanţa cercului vicios stabilit între centrele urbane şi culturile de zarzavaturi consumate în aceleaşi centre, prin intermediul apelor reziduale; are loc o contaminare permanentă cu helminţi a populaţiei. Este meritul şcolii sovietice de helmintologie că a studiat în amănunt rolul solului, al apelor şi al sistemelor de îndepărtare a reziduurilor umane în menţinerea infestaţiei cu ascarizi şi că a găsit în acelaşi timp metodele eficiente antiepidemice de combatere a ascaridiozei.

Calea de pătrundere a ouălor infestante în organismul omului este digestivă. Ouăle sînt aduse la masa omului în special prin zarzavaturi verzi. Nu trebuie să se neglijeze însă rolul altor alimente (fructe) sau rolul mîinilor murdare mai ales pentru cei care vin în contact cu pămînt sau mîl. Muştele de asemenea pot să joace un rol în vehicularea ouălor de ascarid. Răspîndirea ascaridiozei pe globul pămîntesc este generală, în toate continentele şi în toate zonele climatice. În ţara noastră ascaridioza reprezintă helmintoza majoră. Lupaşcu, Ungureanu, Niţulescu şi colaboratorii (1960) afirmă că indicele mediu de infestare este 16,2% pe o perioadă între 1950 şi 1957. Răspîndirea bolii nu este uniformă, existînd zone în care incidenţa în sînul populaţiei depăşeşte 80%, iar în altele coboară în jurul a 1%.

Diagnosticul de laborator al ascaridiozei. *Examenul macroscopic al ascarizilor* eliminaţi prin scaun sau prin vărsătură va conduce fără dificultăţi la identificarea viermelui, pe baza mărimii şi a formei parazitului. În perioada iniţială a bolii, în faza ciclului parenteral, *larvele* pot să fie căutate prin puncţia hepatică sau în expectoraţie, metode greu de realizat şi cu rezultate problematice.

Examenul microscopic coprologic pune în evidenţă ouăle de ascarid. Oul se recunoaşte uşor într-un preparat microscopic direct sau prin metoda de concentrare Willis, datorită caracterelor lui morfologice. Examenul coprologic poate să fie negativ uneori chiar în prezenţa ascarizilor în intestinul uman. Aceasta se întîmplă cînd există o populaţie de ascarizi imatură sau în exclusivitate constituită din masculi. De asemenea există perioade negative spontane sau provocate de acţiunea unor medicamente care nu au eliminat toate exemplarele din intestin, perioade în care nu se elimină ouă. De aceea este indicată repetarea examenului coprologic la 10—15 zile, mai ales pentru controlul eficacităţii tratamentelor.

În general, ouăle de ascarid sînt numeroase în scaun. Diagnosticul este mai dificil cînd ouăle sînt atipice, cînd nu au membrană mamelonată sau au coaja subţire. Uneori masa vitelină este mult retractată în interior. Ouăle apar în scaun după 60—70 de zile de la infestare.

Reacţia de fixare a complementului, intradermoreacţia, reacţiile de precipitare totală sau în inel sînt inconstante şi cu specificitate discutată.

Reacţia de microprecipitare cu larve vii (Leikina). În organismul omului, încă din cursul ciclului perienteric al parazitului apar anticorpi specifici (Podiapolskaia, 1950). Aceştia apar între a 8-a şi a 10-a zi de la infestare, ating maximum în a 25-a zi, apoi scad treptat. Sorescu şi Panaitescu (1958) au decelat anticorpi precipitanţi încă din a 5-a zi de la infestare. Larvele utilizate în reacţie se obţin din ciclul perienteric de la animale. Aceste larve trebuie să fie în stadiul al II-lea, adică după pierderea învelişului chistic şi cu o lungime de 700 μ. Apariţia de precipitate la extremităţile larvelor în contact cu serul cu anticorpi are loc după 12—24 de ore şi este maximă după 48 de ore. Avantajele acestei metode de diagnostic constau în precocitatea rezultatelor pozitive. Datorită complexităţii tehnicii, reacţia de precipitare cu larve vii nu poate să fie recomandată pentru practica curentă a diagnosticului ascaridiozei.

Tabloul sanguin. La persoanele hiperparazitate se observă o scădere a numărului de hematii. În general, anemia din ascaridioză este redusă în raport cu celelalte boli parazitare.

Leucocitoza uşoară este destul de frecventă şi însoţită de limfocitoză. Eozinofilia este maximă între ziua a 10-a şi a 20-a de la infestare, cînd poate să atingă proporţia de 40%. În ascaridioza cronică, eozinofilia se stabileşte la o cifră joasă în jurul a 5%. Cercetarea eozinofilelor are importanţă în prima parte a bolii, perioada ciclului migrator al parazitului, cînd mijloacele de diagnostic de laborator sînt sărace şi formula leucocitară constituie singurul indicator spre diagnostic.

Hipereozinofilia este foarte precoce, începînd din ziua a 6-a—a 8-a şi atinge maximum pînă în a 20-a zi de la infestare. În această perioadă pot să se întîlnească eozinofile în proporţie de 13%. O dată cu dezvoltarea ascarizilor în intestin, eozinofilele scad procentual. Astfel, în momentul apariţiei ouălor în scaun, peste 50 de zile de la infestare, procentul eozinofilelor în formula leucocitară este normal sau situat la o cifră puţin crescută în jurul lui 5.

Larva migrans viscerale

Larva migrans viscerale (sau miaza rampantă viscerală) este o afecţiune provocată de *Toxocara canis* sau *T. cati*. Adulţii acestor specii sînt paraziţi intestinali specifici animalelor din jurul omului. *T. cati* parazitează pisica, iar *T. canis*, cîinele. Ultimul nematod poate să fie întîlnit şi la lup şi vulpe. Adulţii sînt mai mici decît *A. lumbricoides* şi se caracterizează prin prezenţa unor aripioare înguste în regiunea anterioară a corpului. Larvele provenite din ouăle infestante ale acestor paraziţi, ingerate de om, străbat peretele intestinal, trec în vene sau în vasele limfatice, apoi în circulaţia generală şi se vor opri în diferite organe sau în muşchi. Deseori larvele se opresc în ficat; alte organe ca plămînul, rinichiul, inima şi ochiul, pot să constituie de asemenea locul de oprire a larvelor. În jurul larvelor are loc o reacţie granulomatoasă.

Boala poate să fie provocată şi de alte larve de nematode, ca *Ancylostoma caninum, Strongyloides stercoralis* şi chiar de *Ascaris lumbricoides*. Recent, Sorescu, Panaitescu şi Popescu (1960) au descris, în ţara noastră, un caz de *larva migrans* datorită parazitului *T. canis*.

ALTE NEMATODE PARAZITE

Wuchereria bancrofti

Parazitul este un vierme lung; femela are 8 cm, masculul 4 cm (fig. 439). Trăiesc în perechi în vasele limfatice, mai ales în pelvis şi în membre. Femela este vivipară, depune multe larve. Larvele sau *microfilariile* apar în sînge, sînt lungi de 200—400 μ şi subţiri ca o hematie. Sînt foarte active.

Parazitul provoacă boala cunoscută sub numele de elefantiazis. Filarioza este răspîndită în zona tropicală şi subtropicală. Parazitul este transmis omului de o insectă dipteră *Culex fatigans*, care se infestează cu microfilarii în timpul prînzului sanguin. Omul se infestează cu larvele nematodului care trec activ din piesele de înveliş ale trompei insectei pe piele, în timpul unui nou prînz sanguin. Ulterior larvele străbat tegumentele omului şi migrează către vasele limfatice. Diagnosticul bolii constă în identificarea microfilariilor în sînge, în dilataţiile limfatice sau în lichidul din hidrocel. În sînge, microfilariile apar noaptea. Examenul se face în picătură groasă recoltată după ora 22; în frotiu, paraziţii se pot pierde. Uneori paraziţii sînt extrem de rari. Viermii adulţi pot să fie identificaţi în conţinutul abceselor sau în piese operatorii. În formula leucocitară, numărul eozinofilelor apare crescut în procente variate.

Onchocerca volvulus

Parazitul are 2—5 cm lungime și este localizat în vasele limfatice subcutanate. În jurul parazitului se formează o capsulă de țesut fibros. Leziunile nodulare provocate sînt străbătute de microfilariile care trec în vasele limfatice sau în țesutul subcutanat. Uneori paraziții pot să migreze în globul ocular. Boala este transmisă de o insectă din familia *Simulidae*. Aria de răspîndire a oncocercozei cuprinde părți din America centrală, din Mexic și Africa.

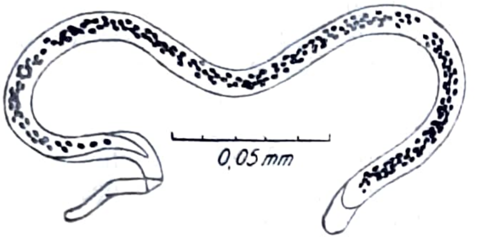


Fig. 439. — *Wuchereria bancrofti*, microfilarie.

Loa loa

Masculul are 3 cm lungime, femela 7 cm. Parazitul trăiește în țesutul subcutanat, dar poate să dea și tulburări oculare. Microfilariile au 250—300 μ lungime și se găsesc în sîngele periferic în timpul zilei. Deseori parazitoza trece neobservată, alteori provoacă inflamații locale sau fenomene alergice. Looza este endemică în Africa centrală. Vectorul bolii este reprezentat prin cîteva specii ale genului *Chrysops*.

Dracunculus medinensis

Masculul speciei se întîlnește rar, datorită vieții lui scurte. Măsoară 4 cm lungime. Femela este subțire și măsoară 50—80 cm lungime. Femela fecundată migrează în membrele inferioare, unde provoacă leziuni ulcerative, pe unde larvele depuse părăsesc în apă corpul omului. Ingerate de un crustaceu, ***Cyclops coronatus***, larvele se dezvoltă și devin infestante. Omul se infestează consumînd apă cu ciclopi purtători de larve de *D. medinensis*. Dracunculoza se caracterizează prin leziuni locale, uneori complicate septic și prin manifestări urticariene. Boala este răspîndită în Africa și Asia de sud.

Gongylonema pulchrum

Gonghilonemoza (gongylonemoza) este o afecțiune rară a omului datorită nematodelor din genul *Gongylonema*. În țara noastră Ungureanu și Fortunescu au identificat *G. pulchrum* la om, extras de sub mucoasa buzei și cavității bucale. Masculul are 2,2 cm lungime și 160 μ grosime. Prezintă pe cuticulă plăci chitinoase și membrane laterale. Femela are 4,5 cm lungime și 110 μ grosime. Oul este ovalar, cu dimensiuni de 46—50 μ. Parazitul se localizează în submucoasă. Boala se manifestă prin tulburări subiective la nivelul localizării helmintului, iar obiectiv viermele poate să fie observat prin transparența mucoasei. Nematodul este un parazit obișnuit al porcului și rumegătoarelor. În evoluția lui necesită trecerea printr-o gazdă intermediară dintre insecte.

TABELUL 140

Caracterele formelor vegetative ale protozoarelor intestinale

	Patogenitate	Formă	Mărime în μ	Mișcări	Citoplasmă	Nucleu
Entamoeba dysenteriae	Patogenă	Obișnuit alungit, pseudopode într-o singură direcție	20/40	Mișcări amiboidale foarte active	Ectoplasma hialină, refringentă Endoplasma granulară cu hematii înglobate	Greu vizibil, în stare proaspătă, excentric cariozom central
Entamoeba coli	Nepatogenă, excepțional întreține colite preexistente	Pseudopode în mai multe direcții	20—30	Mișcări amiboidale mai puțin active	Diferența între ectoplasmă și endoplasmă puțin marcată	Vizibil în stare proaspătă, cariozom excentric
Entamoeba hartmanni	Nepatogenă	Pseudopode în mai multe direcții	6—10	Mișcări amiboidale	Diferența între ectoplasmă și endoplasmă puțin marcată	Central, cariozom central
Endolimax nana	Nepatogenă	Pseudopode într-o singură direcție	6—10	Mișcări amiboidale	Diferența între ectoplasmă și endoplasmă puțin marcată	Excentric, cariozom central

TABELUL 140 (continuare)

	Patogenitate	Formă	Mărime în μ	Mişcări	Citoplasmă	Nucleu
Pseudolimax bütschlii	Nepatogenă		8–10	Mişcări amiboidale lente	Diferenţa între ectoplasmă şi endoplasmă puţin marcată	Cariozom central
Dientamoeba fragilis	Nepatogenă		8–12	Mişcări amiboidale	Diferenţă netă între ectoplasmă şi endoplasmă	2 nuclei
Giardia intestinalis	Patogenă	Piriformă, cu un fals citostom şi 8 flageli	10–20	Mişcări de rostogolire cu flageli	Are 4 perechi de blefaroplaşti	2 nuclei anteriori
Trichomonas intestinalis	Neprecizat	Piriform, cu un mic citostom, 5 flageli, membrană ondulantă	10–20	Mişcări vioaie cu flagelii şi membrana ondulantă	Are un blefaroplast, un axostil	Nucleu anterior
Chilomastix mesnili	Patogen uneori	Ovalar-piriform, 3 flageli, un şanţ citostomal cu flagel recurent	10–20	Mişcări de rostogolire într-o parte, cu flagelii	Are 6 blefaroplaşti	Nucleu anterior
Balantidium coli	Patogen	Ovalar-piriform, cu cili, un şanţ citostomal	50–200	Mişcări de rostogolire cu cilii	Are 2 vacuole pulsatile mari	Un macronucleu reniform şi un micronucleu rotund

TABELUL 141

Caracterele chisturilor de protozoare intestinale, eliminate în scaun

	Forma şi perete	Mărime în μ	Citoplasma	Nucleii
Entamoeba dysenteriae	Rotund sau uşor ovalar, perete dublu, subţire	5–20	Baghete siderofile. Rezervă de glicogen la chistele tinere	4 nuclei mici la niveluri diferite. Nucleul are structura ca la forma vegetativă
Entamoeba coli	Rotund sau uşor ovalar, perete dublu	15–25	Baghete siderofile mai rare. Rezerva de glicogen la chistele tinere	8 nuclei la chistele mature la niveluri diferite. Chistele imature au mai puţini nuclei. Structura nucleului ca la forma vegetativă
Entamoeba hartmanni	Rotund sau uşor ovalar	6– 8	Baghete siderofile	4 nuclei, cu structura ca a formei vegetative
Endolimax nana	Ovalar	6–10	Rezervă de glicogen	4 nuclei mici, de obicei grupaţi, cariozom excentric
Pseudolimax bütschlii	Ovalar sau uşor asimetric	8–10	Vacuolă cu glicogen (iodofilă) netă	Nucleu unic
Dientamoeba fragilis	Ovalar	14	Clară	4 nuclei dispuşi în linie dreaptă
Giardia intestinalis	Ovalar, perete dublu	8–12	Un fascicul de flageli	4 nuclei, grupaţi câte doi
Chilomastix mesnili	Ovalar sau piriform, perete dublu	5–10	Un blefaroplast. Citostomul schiţat cu flagelul recurent	Nucleu unic
Balantidium coli	Ovalar sau rotund, perete dublu	50–60	Vacuola pulsatilă	Nucleu unic (macronucleul)

TABELUL 142

Diagnosticul protozoozelor intestinale

Parazit	Afecțiune	Produs de cercetat	Metodă de cercetare	Elemente parazitare în scaun
Entamoeba dysenteriae	Amibiază	Scaun obișnuit Scaun diareic Scaun după purgație	Examen microscopic Culturi	Chiste Trofozoiți
Entamoeba coli	Neprecizat	Scaun	Examen microscopic	Chiste. Trofozoiți
Giardia intestinalis	Giardioză	Scaun obișnuit Bilă (Scaun după purgație)	Examen microscopic	Chiste Trofozoiți, foarte rar
Chilomastix mesnili	Uneori patogen	Scaun obișnuit Scaun diareic Scaun după purgație	Examen microscopic Culturi	Chiste Trofozoiți
Isospora sp. *Eimeria sp.*	Coccidioză	Scaun	Examen microscopic Culturi pentru maturarea oochiștilor	Oochiști
Balantidium coli	Balantidioză	Scaun obișnuit Scaun diareic Scaun după purgație	Examen microscopic Culturi	Chiste Trofozoiți
Trichomonas intestinalis	Neprecizat	Scaun obișnuit Scaun după purgație	Examen microscopic Culturi	Trofozoiți

TABELUL 143

Diagnosticul speciilor de Plasmodium în frotiul de sînge (colorația May-Grünwald-Giemsa)

	Hematia	Inelul tînăr	Inelul deformat	Amiba	Prerozeta	Rozeta	Macrogametocitul	Microgametocitul
Plasmodium vivax	Hipertrofiată, colorată palid, prezintă granulațiile Schüffner	Formă de inel cu pecete, 1/3 din diametrul hematiei	Pseudopode în partea opusă nucleului, pigment malaric, colorat în ocru, în cantitate mică	Pseudopode în toate direcțiile, protoplasma pare zdrențuită, vacuola se păstrează, pigmentul malaric în grăunțe fine sau bastonașe	Protoplasma mai adunată, fără vacuolă, nucleul este divizat	16—24 merozoiți situați pe mai multe planuri, pigmentul strîns în blocuri centrale sau excentrice	Ovalar-rotund, mai mare decît hematia normală, protoplasma violet-albastră, nucleu compact, pigment fin, dispus uniform	Mare, ovalar-rotund, protoplasma violet-roșcată, nucleul mare, fără o delimitare precisă, pigmentul în grunji mai mari
Plasmodium malariae	Normală ca dimensiuni, colorată normal, fără granulații	Aceleași caractere ca inelul de *P. vivax*	Un sngur pseudopod opus nucleului, forma de rachetă sau piriform	Alungită, ovalară sau în bandă ecuatorială, cu sau fără alveolă, pigmentul în granule mari, brune, în șiruri, nucleu alungit	Parazitul umple aproape toată hematia, fără vacuolă, nucleul divizat, alungit	6—12 merozoiți, situați pe un singur plan, pigmentul strîns într-un bloc, de obicei central	Rotund, mai mic decît hematia normală, colorat ca și macrogametocitul de *P. vivax*, pigmentul abundent, colorat închis	Rotund, mic, colorat ca și microgametocitul de *P. vivax*

TABELUL 143 (continuare)

	Hematia	Inelul tînăr	Inelul deformat	Amiba	Prerozeta	Rozeta	Macrogametocitul	Microzametocitul
Plasmodium falciparum	Normală ca dimensiuni, petele Maurer puține, colțuroase, mari, inegale ca mărime	Inelul foarte tînăr este subțire, fin, 1/5 — 1/6 din diametrul hematiei ; ulterior inelul seamănă cu cel de *P. vivax*	Inele ușor deformate, apar rareori	Absentă în sîngele circulant	Absentă în sîngele circulant	Absentă în sîngele circulant	Semilunar, mai mare decît hematia normală, protoplasma violet-albastră, nucleu compact, pigmentul dispus în coroană în jurul nucleului	Semilunar, mare, protoplasma violet-roșcată, nucleul mai puțin compact, mai mare, pigmentul împrăștiat neregulat în toată zona centrală

TABELUL 144

Diagnosticul helmintozelor

Parazit	Boală	Produs de cercetat pentru larve	Produs de cercetat pentru adulți		Produs de cercetat pentru ouă sau embriofori	Număr de zile între infestare și apariția ouălor sau embrioforilor în scaun	Număr de zile între infestare		Reacții imunologice
			observat spontan	după tratament			și creșterea numerică a eozinofilelor	și momentul maxim al eozinofiliei	
Fasciola hepatica	Fascioloza	—	—	—	scaun bilă	90	Precoce	90—120	+
Taenia solium *Taenia saginata*	Tenioza	—	scaun	scaun	scaun (rareori)	90			
Echinococcus granulosus	Hidatidoza	Material din chist extras sau eliminat din corp pe o cale naturală	—	—	—	—			+
Hymenolepis nana	Himenolepidodoza	—	—	scaun	scaun	20			
Diphyllobothrium latum	Botriocefaloza	—	scaun	scaun	scaun	14—24	12	40	
Trichinella spiralis	Trichinoza	Sînge (rareori)	—	scaun	—	—	8	20—25	+
Trichuris trichiura	Tricocefaloza	—	—	scaun	scaun				
Strongyloides stercoralis	Strongiloidoza	Scaun Bilă Expectorație (debut)	—	scaun	—	—		40	
Ancylostoma duodenale	Anchilostomoza	Expectorație (debut)	—	scaun	scaun	50	10—20	90	
Enterobius vermicularis	Oxiuroza	—	scaun	scaun	raclare perianală	21	8	28	
Ascaris lumbricoides	Ascaridoza	Expectorație (debut)	scaun	scaun	scaun	60—70	6—8	20	

TABELUL 145

Diagnosticul diferenţial al ouălor şi embrioforilor de helminţi

	Formă	Opercul	Dimensiuni în μ	Culoare	Embrion
Fasciola hepatica	oval	+	140/80	galben	—
Dicrocoelium dendriticum	oval asimetric	+	40/25	brun	+
Opisthorchis felineus	oval	+	30/15	brun	+
Clonorchis sinensis	oval	+	30/17	brun închis	+
Paragonimus ringeri	oval	+	90/60	brun roşcat	—
Schistosoma haematobium	oval	—	150/60	galben	+
Taenia saginata	oval-rotund	—	35/50	brun cenuşiu	+
Taenia solium	rotund	—	30/40	brun cenuşiu	+
Hymenolepis nana	oval	—	50/60	cenuşiu transparent	+
Hymenolepis diminuta	rotund	—	60/80	galben	+
Dipylidium caninum	rotund	—	40/50	brun	+
Diphyllobothrium latum	oval	+	70/45	galben-brun	—
Trichinella spiralis	larve				
Trichuris trichiura	oval	—	50/22	brun	—
Strongyloides stercoralis	larve				
Ancylostoma duodenale	oval	—	56/36	transparent	—
Necator americanus	oval	—	70/40	transparent	—
Trichostrongylus sp.	oval	—	76/40	transparent	—
Enterobius vermicularis	oval asimetric	—	50—55/25	cenuşiu	
Ascaris lumbricoides	oval	—	65/50	transparent brun	+ —

Dr. **ALTERAŞ ISAC**
Dr. **COJOCARU ION**

MICOLOGIE

GENERALITĂȚI

Prin *micoze* înțelegem bolile provocate de ciuperci parazite (paraziți criptogamici sau paraziți micotici). Ele sînt răspîndite pe întreaga suprafață a pămîntului; totuși, distribuția lor geografică este oarecum limitată, unele specii găsindu-se mai ales în anumite regiuni.

Ținînd seama de localizarea lor, micozele se pot împărți în două mari categorii: *micoze superficiale*, care afectează cu predilecție straturile superficiale ale pielii și fanerelor și *micoze profunde*, care se localizează în țesutul celular subcutanat, mușchi, oase și chiar viscere.

Micozele superficiale sînt boli de largă răspîndire, ocupînd primul loc în ansamblul general al micozelor. Faptul că ele se localizează aproape cu exclusivitate la nivelul pielii sau fanerelor — peri și unghii — a făcut să li se atribuie denumirea de *dermatomicoze*. Din această cauză, ciupercile parazite care le provoacă au fost numite dermatofiți. În practica de laborator, dermatomicozele (sau mai corect *dermatofițiile*) sînt cele care se prezintă cel mai frecvent (cel puțin în țara noastră) pentru confirmare de diagnostic. De aceea asupra lor vom insista mai mult.

Tot în grupa micozelor superficiale intră și *candidozele* — boli provocate de ciupercile din grupul *Candida* — asupra cărora vom reveni într-un capitol aparte.

Micozele profunde, fiind mult mai rar întîlnite și unele chiar aproape inexistente în țara noastră, vor face obiectul unei expuneri mai puțin amănunțite.

Înainte de a intra în descrierea tehnicilor de laborator proprii micozelor și a interpretării rezultatelor obținute, este necesar în prealabil să dăm cîteva noțiuni sumare asupra morfologiei generale a paraziților micotici.

Ciupercile formează un grup aparte de microorganisme citoplasmatice, nucleate, mobile într-un sistem de tuburi și care prezintă unele caractere ce le fac să ocupe un loc special, încă insuficient precizat, între lumea vegetală și cea animală.

Orice ciupercă este formată dintr-un *tal*, mono- sau pluricelular, care prezintă o parte *vegetativă*, ce-i asigură creșterea și alta reproductivă, destinată reproducerii și diseminării.

Talul vegetativ este alcătuit din *filamente miceliene* sau *hife*, tuburi alungite, mai mult sau mai puțin ramificate, care nu sînt altceva decît celule cu un conținut protoplasmatic variabil și membrană rezistentă. Aceste celule se pot dezvolta în toate sensurile, putînd fi împărțite, la intervale variabile, prin pereți despărțitori, sau să rămînă neseptate.

Elementele miceliene mai scurte, formate prin apariția septurilor, pot să rămînă ca atare, luînd aspectul unei tulpini de bambus, sau se pot septa și mai mult, alcătuind lanțuri de celule poliedrice, așezate cap la cap, în lanț, ca un șirag de mărgele. Alteori, aceste fragmente celulare se pot despărți, constituind elemente separate de formă dreptunghiulară sau rotunjite, de mărime variabilă, care au fost impropriu numite „spori" (mai corect artrospori), nefiind decît forme de rezistență și nu organe adevărate de reproducere.

Structura și evoluția filamentelor miceliene descrise mai sus formează ceea ce se numește un *miceliu adevărat*, care trebuie deosebit uneori de falsul miceliu sau *pseudomiceliu*, caracteristic ciupercilor levuriforme, mai ales celor care fac parte din grupul *Candida*. Pseudomiceliul se formează numai prin procesul de *înmugurire* a celulelor, care pot să rămînă legate una de alta, fiind separate între ele prin constricții. Deosebirea dintre un pseudomiceliu și un miceliu adevărat este uneori greu de făcut, deoarece practica ne arată că și la ciupercile care se înmulțesc prin înmugurire, poate să existe un miceliu adevărat.

Elementele descrise mai sus — filamente miceliene și artrospori — sînt singurele forme sub care se prezintă ciuperca în viața parazitară, deci și în materialul patologic de examinat. Elementele speciale, care fac parte din aparatul sporifer și intră în componența talului reproductiv, nu se observă decît în „culturi", urmînd să fie amintite pe scurt la capitolul corespunzător.

RECOLTAREA MATERIALULUI PATOLOGIC

Instrumentele de care ne servim în acest scop sînt: pense de epilat, lanțete sau ace de corpi străini, anse de platină, lame de sticlă, pipete Pasteur etc. Dat fiind faptul că o mare parte din ciupercile patogene care provoacă micozele sînt ușor transmisibile, este necesar să respectăm mijloacele minime de asepsie, privitoare la *sterilitatea instrumentelor de recoltat.* Rezistența mare a paraziților micotici la antisepticele antibacteriene fiind cunoscută, asepsia mijloacelor de recoltare va fi asigurată prin flambarea imediată a ustensilelor necesare, care permite, în același timp și efectuarea examenelor micologice în serie, cu aceleași instrumente, la caz de nevoie. Pentru a asigura o bună examinare trebuie să acordăm atenția cuvenită și *alegerii locului de recoltare* a materialului de examinat. Ciupercile negăsindu-se în mod egal răspîndite la locul afecțiunii, iar evoluția lor lentă favorizînd adesea în același timp și dezvoltarea germenilor saprofiți mai accesibili recoltării, recoltarea trebuie făcută din cît mai multe locuri, mai ales din zonele mai recente ale formării leziunilor, unde agentul patogen care ne interesează poate să fie găsit mai cu ușurință.

În sfîrșit, în cazul cînd diagnosticul micologic trebuie să conțină și rezultatul însămînțărilor materialului patologic, acesta trebuie păstrat pînă la efectuarea însămînțării în condiții de sterilitate, pentru a evita suprainfectarea lui. (Acest lucru se recomandă pentru lame, cutii Petri, eprubete etc.).

Materialul patologic, în care se poate pune în evidență prezența ciupercilor patogene, este foarte variat, el depinzînd în mare măsură de condițiile de localizare a paraziților. Agenții micozelor superficiale, care afectează de predilecție straturile superficiale ale pielii și fanerelor — dermatofiții — vor fi căutați în: peri, scuame, unghii. Pentru ciupercile care se localizează mai profund vor fi recoltate produse ca: puroi, exsudate, expectorație, lichide biologice (mai rar). Tot ca material patologic mai pot să fie recoltate: secreții dinafara diferitelor aparate (mai ales genital), urina, materiile fecale. În sfîrșit, *biopsia* poate să fie practicată în orice fel de micoză, constituind elementul cel mai prețios de apreciere a raporturilor ciupercii în cauză cu țesuturile și modul lor de reacție față de agresiunea parazitului.

Înainte de a trece la tehnica recoltării materialului patologic supus cercetării micologice, este necesar să precizăm cîteva date sumare asupra aspectului clinic sub care se pot prezenta variatele manifestări cutanate, care urmează să fie diagnosticate prin examenul micologic.

Dat fiind că medicul care trimite bolnavul la examen micologic trebuie să indice *regiunea* de recoltare a materialului de cercetat (de exemplu pielea capului, barbă, coapsă, axilă, spațiile interdigitale de la mîini sau picioare, unghiile mîinilor sau picioarelor etc.), aceasta poate să prezinte următoarele aspecte:

a) *Pielea capului* poate fi suspectată ca avînd o micoză, atunci cînd prezintă suprafețe de formă și mărime variabile, parțial lipsite de păr, sau, ca și cum ar fi fost tunse cu mașina, zone la nivelul cărora perii sînt rupți sau păstrați, fragili (se smulg ușor și sînt lipsiți în general de luciul caracteristic). Aceste insule alopecice pot să fie unice sau multiple, confluente sau disparate, uneori chiar foarte discrete, simulînd o simplă mătreață, cu scuame subțiri sau mai groase și perii abia modificați.

Modificarea perilor poate să intereseze lungimea lor, consistența, culoarea și forma, dînd aspectul părului „micotic", rupt, decolorat, uneori de forma unor litere (în *s*, *z*, *v*). Aceste aspecte pot să realizeze tabloul uneia dintre cele trei forme clinice cunoscute de micoză a pielii capului: *tricofiția*, *microsporia* și *favusul* care urmează să fie precizate prin examenul micologic al perilor. Dacă pentru tricofiție și microsporie aspectele clinice sînt de multe ori asemănătoare, mai ales la copii, favusul pielii capului (și la adult) are cîteodată unele elemente în plus, ce-l fac mai ușor de diagnosticat. Acestea sînt: părul mai lung, cenușiu, de culoarea părului de porc, alopecie cicatriceală (în fazele sale mai înaintate) și mai ales godeul.

Godeul favic este o leziune clinică rotundă, formată din dezvoltarea micro- apoi macroscopică a unei colonii de filamente miceliene în jurul unui fir de păr atacat de ciupercă. Este de culoare galbenă-deschisă, consistentă, sfărîmicioasă, aderentă de piele, putînd să presare uneori întreaga suprafață a pielii capului. Acesta este aspectul favusului cu godeuri, cel mai ușor de recunoscut dintre micozele pielii capului.

În majoritatea cazurilor, aspectul sub care se prezintă micozele pielii capului sînt de tipul leziunilor uscate, fără inflamație și supurație. Uneori însă ele pot să îmbrace și forma unor adevărate tumorete, în general unice, mai rar multiple, care fac relief deasupra pielii, fiind de culoare mai roșie avînd suprafața lipsită de păr și străbătută de o serie întreagă de orificii, care, prin apăsare, lasă să curgă la exterior un conținut purulent, amestecat uneori cu sînge. Aceste aspecte, care pot să fie date îndeosebi de tricofiție și mult mai rar de microsporie, constituie ansamblul entității micologice cunoscută sub numele de *Kerion Celsi*.

Menționăm de asemenea pe pielea capului aspectul leziunilor micotice întîlnite la adult cu predominanță la femei, cu peri punctați, de culoare neagră, cît o gămălie de ac, care se pot găsi în număr variabil (uneori foarte puțini), alături de mici plăcuțe rotunde, atrofice, cicatriceale, împrăștiate neregulat printre perii lungi sănătoși. Acest aspect, de obicei trecut cu vederea în multe ocazii și care trebuie căutat mai ales la mamele ai căror copii fac repetat tricofiții, constituie ceea ce se cunoaște sub numele de ,,*tricofiție cronică a adultului*".

b) *Regiunea păroasă a feței* — barba — formează și ea un sediu relativ frecvent de localizare a dermatofiților, numărul cazurilor fiind însă mult inferior celui cu localizări pe pielea capului. Și aci putem întîlni îndeosebi tricofiții uscate sau supurate, și mult mai rar, microsporii. Aspectele clinice sînt în mare parte asemănătoare cu cele din micozele pielii capului. Uneori pot să apară și forme intermediare între tricofiția uscată și cea supurată.

c) *Pielea glabră* ne oferă cele mai variate aspecte ale localizărilor micotice. Leziunile provocate de ciuperci pot să îmbrace caractere mai mult sau mai puțin tipice, care variază în funcție de sediul afecțiunii. Astfel, pe orice parte a corpului (trunchi, membre, față), putem să întîlnim suprafețe de diverse mărimi, de la 1 cm la cîțiva cm diametru, de obicei rotunde, cu pielea de nuanță roșie-variabilă, acoperite de scuame mai mult sau mai puțin abundente, cu centrul de obicei mai palid, iar marginile în general regulate, tivite uneori de un lanț de vezicule, cîteodată cu dublu sau chiar cu triplu contur. Acest tablou simptomatic alcătuiește leziunea micotică cunoscută sub clasica denumire de *herpes circinat*.

Plicile sînt sediul frecvent de localizare a micozelor cutanate superficiale. În marile plici — axilare, submamare, inghinale — leziunea micotică poate să cuprindă o suprafață relativ întinsă de culoare cafenie-ștearsă, acoperită de scuame subțiri, uscate, cu marginile regulate sau festonate, alcătuind tabloul clinic al *eritrasmei*.

Tot în plica inghinală pot să apară placarde unilaterale sau bilaterale, care cuprind și partea superioară a coapselor, trecînd, în unele cazuri, și pe scrot sau în șanțul interfesier. Suprafața lor prezintă un epiderm ceva mai inflamat, avînd margini bine delimitate de o dungă mai pronunțată, ca trasă cu compasul. Acest ansamblu de leziuni realizează aspectul denumit *eczema marginatum* (*Hebra*).

În plicile mari, ochiul examinatorului poate să observe uneori pete variabile ca formă și mărime, unele izolate, altele confluente în plăci zemuinde, cu marginile puțin festonate sau tivite de un guleraș de piele dezlipită, de aspect mai inflamator. Aceste leziuni, înglobate în termenul generic de *intertrigo*, pot să fie provocate de paraziți criptogamici din grupul *Candida*. Localizarea lor poate să cuprindă și sfera genitală, la ambele sexe, determinînd apariția *balanopostitei* sau *vulvovaginitei* cu *Candida*, boli pe care vechii clinicieni le denumeau ,,diabetide genitale".

În ceea ce privește plicile mici, spațiile interdigitale de la mîini și (mai ales) de la picioare sînt sediul localizării frecvente a ciupercilor, în special a dermatofiților. Manifestările clinice pot să fie uneori foarte discrete, bolnavul prezentînd macerație epidermică, eroziuni minime sau descuamație mai mult sau mai puțin importantă. Leziunile pot să cuprindă atît fața plantară, cît și cea dorsală a piciorului. Acestea pot să fie presărate de vezicule sau bule, pe un fond de roșeață epidermică, sau pot să prezinte numai un aspect uscat, de descuamație difuză sau de îngroșare a pielii acelei regiuni. Acesta este în mare tabloul clinic al bolii micotice, cea mai frecvent întîlnită între micozele cutanate și denumită *epidermofiție*. Ea poate să fie interdigitală, plantară, palmară sau asociată.

Ciupercile patogene provoacă manifestări clinice cutanate, foarte variate. Spațiul însă nu ne-a permis descrierea lor în amănunțime, ci numai schițarea lor.

d) *Unghiile* pot să fie de asemenea sediul unor leziuni micotice. Frecvența lor, deși este destul de mare, este totuși inferioară celei a leziunilor micotice ale părului și pielii. Dat fiind ritmul încet de invadare a unghiilor de către elementele fungice, îmbolnăvirea acestora poate să treacă mult timp neobservată. Leziunile de *onicomicoză* pot să apară de aceea numai într-o fază mai înaintată de invadare a plăcii unghiale de către paraziții micotici. În aceste cazuri, unghia se prezintă deformată, îngroșată la marginea liberă sau laterală, iar uneori este dezlipită de patul unghial și are sub ea un depozit galben-verzui-brun. Alteori, din contra, placa unghială poate să fie subțiată și presărată cu pete albe-gălbui, opace. Aspectul regulat, lucios, al unghiei, poate să fie brăzdat de șanțuri transversale și leziuni punctiforme care o străbat de la o margine la alta. Distrugerea unghiei de către parazit poate să fie atît de înaintată, încît, după mulți ani, placa unghială să nu se mai prezinte decît sub forma unor resturi cornoase.

Alte leziuni unghiale pot să fie provocate de paraziții micotici din grupul *Candida*. Un tablou simptomatic aproape tipic al acestor leziuni prezintă așa-numitele „unghii verzi'', în care placa unghială este neregulată, străbătută de șanțuri transversale. Marginile laterale sînt dezlipite, aici formîndu-se un depozit pulverulent de culoare verzuie-brună. De obicei, deformarea unghiei se însoțește și de inflamația țesutului periunghial, care prezintă un epiderm roșu, lucios, ce acoperă uneori un conținut purulent. În aceste cazuri avem de-a face cu *onixis* și *perionixis* cu *Candida*.

Tehnica recoltării. Perii din zonele afectate (pielea capului, barbă, sprîncene) se recoltează cu ajutorul unei pense epilatorii, luînd cantități suficiente din porțiuni diferite, bănuite că sînt parazitate. Este bine să se recolteze mai ales peri modificați în aspectul, culoarea și lungimea lor și mai ales din cei care se smulg ușor și fără dureri la tracțiune. Perii decolorați, rupți la o distanță mai mare sau mai mică de la emergență, friabili, îngropați în grosimea scuamelor de la nivelul leziunilor, sînt de obicei cel mai intens parazitați. În general, se recomandă să se recolteze perii de la marginea focarelor de boală, acolo unde se află zona maximă de extensiune a ciupercii. Aceste precauții sînt de luat în seamă mai ales în micozele supurate ale pielii capului sau bărbii, în care perii parazitați sînt extrem de greu de găsit, îndeosebi în centrul lezinilor, datorită procesului de supurație foliculară, care duce în mod spontan la eliminarea lor în această zonă. De multe ori, în astfel de cazuri, o singură recoltare nu este suficientă, aceasta trebuind să fie repetată de mai multe ori, mai ales atunci cînd aspectul clinic al leziunii de cercetat este cel al unei micoze.

O atenție mare trebuie acordată așa-numiților „peri punctați'' sau „puncte negre'', care nu sînt altceva decît fragmente foarte mici de peri parazitați, încrustate în piele și care, uneori, din cauza rarității lor, pot să scape ochiului liber. Recoltarea acestor peri, nefiind posibilă cu pensa epilatorie din cauza ruperii lor, chiar sub emergența foliculară, îi vom scoate cu un vîrf de ac flambat sau cu un ac de corp străin.

Perii astfel recoltați, în cazul cînd nu sînt supuși examinării imediate, se vor păstra între două lame de sticlă șlefuite, pînă la utilizarea lor micologică (examen direct, însămînțări etc.).

Scuamele se vor recolta, de preferință, de la periferia leziunilor, prin raclare, cu ajutorul unei mici chiurete sau unui vaccinostil, ori, în lipsă, prin răzuirea metodică cu marginea unei lame de sticlă șlefuită. Recoltarea lor se va face, de asemenea, în cantitate cît mai mare și din locuri diferite, dînd preferință leziunilor mai recente, care au scăpat tratamentului antiseptic sau antifungic. În cazul leziunilor cutanate putem întîlni de multe ori prezența de vezicule sau bule, de diferite mărimi, cu conținut limpede sau purulent, care sînt uneori singurele elemente de manifestare a micozei. În astfel de cazuri, recoltarea materialului se face cu ajutorul unei forfecuțe mici de manechiură, în prealabil flambată, alegerea căzînd asupra elementelor nou-apărute, de la care vom alege plafonul veziculei sau bulei. Materialul astfel recoltat se va păstra între două lame de sticlă.

Unghiile constituie un material patologic în care elementele fungice sînt, de cele mai multe ori, greu de pus în evidență. Recoltarea trebuie să se facă din partea modificată a unghiei, acolo unde aceasta se prezintă îngroșată, unde marginile libere sau laterale sînt dezlipite de patul unghiei, avînd sub ele un depozit sfărîmicios, de culoare galbenă-verzuie pînă la brună. Acest depozit trebuie raclat cu chiureta sau vîrful lanțetei din profunzime, porțiunea de la suprafață fiind contaminată cu germeni saprofiţi. În cazul unei unghii foarte mult îngroşate, cu aspect clinic de micoză, dacă primele recoltări nu au dat nici un rezultat, este indicat să se taie mai multe porţiuni mici din lama unghială, să se pună să fiarbă timp de 1/2—1 oră într-o soluţie de hidroxid de potasiu 10%, pînă la macerarea lor, şi după răcire, această masă cornoasă să fie examinată microscopic.

Exsudatele şi *secreţiile mucoaselor* se recoltează cu ajutorul unui tampon de vată sterilizat (ca pentru exsudatele faringiene) sau cu ansa de secreţie. Aşa se procedează pentru cavitatea bucală sau vaginală. Prezenţa de depozite albe-cremoase de pseudomembrane şi însăşi a unei secreţii abundente va fi folosită pentru depozitarea lor pe lamă, în vederea frotiurilor sau examinării directe la microscop. În practică, aceste exsudate şi secreţii nu se păstrează mult timp, ci se recomandă să fie cercetate extemporaneu.

Puroiul, destinat examinării micologice, se recoltează de preferinţă din leziunile închise prin puncţie aseptică, cu un ac gros adaptat la o seringă cu etanşeitate perfectă, ambele sterilizate prin fierbere îndelungată. Acesta se poate întrebuinţa pentru examen direct sau se poate păstra într-o eprubetă sterilă, pentru însămînţări.

Puroiul din leziunile deschise, fistulizate, se va recolta cu o ansă sau o pipetă Pasteur, după cum este vorba de o însămînţare sau de un examen direct. Este preferabil să se şteargă în prealabil suprafaţa fistulizată cu un tampon steril îmbibat de o soluţie antiseptică — iod sau alcool — după care vom lăsa să se scurgă primele picături de puroi.

În cazul că se bănuieşte o micoză profundă trebuie să se acorde o mare atenţie puroiului de aspect uleios, clar, în care putem găsi uneori prezenţa grunjilor caracteristici, albi-gălbui sau negri, de mărime variabilă, care pot să scape — mai ales cei mici — examenului cu ochiul liber. Grunjii foarte mici nu sînt decelabili în masa puroiului decît microscopic.

Expectoraţia are o valoare mai mică ca material patologic de recoltare; din aceasta nu se poate efectua un examen micologic de siguranţă. Aceasta din cauză că, trecînd prin căile aeriene superioare şi gură, produsul expectorat se încarcă cu o serie întreagă de saprofiţi banali, oaspeţi obişnuiţi ai acestor căi, care modifică astfel rezultatul dorit. Singura expectoraţie care prezintă o valoare mai sigură, este cea bronhială, recoltată prin spălătură bronşică şi care se păstrează, pentru examenul dorit, în eprubete sau cutii Petri sterile. Recoltarea sputei obişnuite se face în vase de acelaşi gen, preferabil însă după ce bolnavul a făcut o spălătură îngrijită a cavităţii bucale, cu un antiseptic oarecare: ceai de muşeţel, rivanol, clorură de potasiu, permanganat etc.

Urina se va recolta totdeauna în mod steril; la *femeie*, cu ajutorul unei sonde Nélaton, sterilizată prin fierbere — după o prealabilă spălare a organelor genitale externe (cu ceai de muşeţel sau permanganat de potasiu); la *bărbat*, fără sondaj, dar numai după aceleaşi precauţii ca mai sus, lăsînd în acest caz să se scurgă primele picături de urină. Eprubetele de recoltare vor fi de asemenea sterile şi închise.

Materiile fecale vor fi adunate, în cantitate foarte mică, într-o eprubetă sterilă, care conţine ser fiziologic amestecat cu penicilină şi streptomicină (cam 5 000 u./ml).

Recoltarea altor produse patologice ca lichide pleurale, peritoneale, lichid cefalorahidian, sînge, se face mult mai rar în practică şi se execută în aceleaşi condiţii de sterilitate ca şi pentru examenele bacteriologice.

Un loc important în alegerea materialului patologic trebuie rezervat şi *biopsiei*, care constituie un mijloc preţios de diagnostic adjuvant în multe cazuri de micoză. Nu intrăm aici în amănunte asupra tehnicii, aceasta aparţinînd domeniului histopatologiei.

CERCETAREA MICOLOGICĂ A MATERIALULUI PATOLOGIC

Diagnosticul unui material patologic supus cercetării micologice se poate face prin: *examenul microscopic direct* al produsului patologic recoltat şi *diagnosticul prin culturi*, care se pune în urma rezultatului însămînţărilor pe medii de cultură. Aceşti doi timpi ai diagnosticului micologic se completează uneori prin reacţii imunobiologice (seroreacţii, intradermoreacţii şi inoculări experimentale).

EXAMENUL DIRECT

Examenul direct al materialului patologic este procedeul care ne dă, în majoritatea cazurilor, diagnosticul de orientare imediată asupra naturii micotice a afecţiunii în cauză. Acest examen se face extemporaneu, la microscop, între lamă şi lamelă, preparatele colorate fiind prea laborioase şi nedînd rezultatele dorite (cu excepția colorației Hotchkiss-McManus, de care vom vorbi mai tîrziu). Pentru produsele foarte subțiri și transparente, cum sînt lichidele centrifugate, urina, maceratul de materii fecale, expectorațiile, secrețiile etc., este suficient să fie așezate direct între lamă și lamelă sau într-o picătură de ser fiziologic.

Materialele patologice mai consistente, mai groase (peri, scuame, unghii) trebuie însă clarificate. Această clarificare sau *disociere* se face cu ajutorul unor substanțe care au acțiunea de a topi celulele cornoase, făcînd vizibilă prezența paraziților criptogamici. Cea mai cunoscută este metoda clasică cu *hidroxid de potasiu* în soluție apoasă de 10–30%. Altă substanță disociantă întrebuințată în mod curent este soluția de *cloral-lactofenol* Aman, care constă în amestecul de: cloral hidrat cristalizat, acid fenic, și acid lactic — în părți egale.

În sfîrșit, o altă metodă de clarificare, care a dat rezultate foarte bune și se întrebuințează în mod curent este folosirea *sulfurii de sodiu* în soluție apoasă sau hidroalcoolică 10% (Krastelevskaia). Se preferă soluția hidroalcoolică, care este mai stabilă, potrivit formulei: sulfură de sodiu (*Natrium sulfuratum*) 1 g, alcool pur 2,5 ml, apă distilată 7,5 ml.

Se recomandă ca această soluție să fie păstrată în sticluțe-picătoare de culoare închisă, la adăpost de lumină și să nu fie utilizată mai mult de 3–4 săptămîni, putînd să precipite. De aceea se va prepara o dată numai o cantitate de cel mult 10–20 g.

Avantajele și dezavantajele diverselor metode de disociere

Metoda cu potasă caustică este cea mai des utilizată în practica micologică și dă, în general, imagini foarte frumoase. Preparatele disociate cu potasă caustică trebuie încălzite la flacăra becului de gaz, evitînd însă fierberea, care poate să provoace distrugerea preparatului sau modificări de structură, datorită apariției de artefacte ce modifică rezultatul examinării. În plus, nici nu se poate păstra mult timp materialul preparat.

Soluția Aman este un bun disociant, care se încălzește ușor la flacără. Această soluție clarifică mai încet preparatul, mai ales la rece, însă dă artefacte mai puține și se păstrează mai mult. Deoarece sub acțiunea luminii se închide la culoare, se recomandă să fie păstrată în sticle brune.

Sulfura de sodiu 10% are avantajul de a clarifica cel mai rapid produsul de examinat, disocierea acestuia făcîndu-se la rece, fiind deci utilă mai ales în examenele micologice în serie (colectivități). În plus, păstrează intactă vizibilitatea raportului dintre țesutul parazitat și ciuperca invadantă, producînd cele mai puține artefacte. Prezintă însă dezavantajul că este urît mirositoare, degajînd hidrogen sulfurat prin acțiunea asupra celulelor cornoase.

Alegerea acestor soluții disociante este în funcție și de scopul urmărit. În practica curentă, cînd avem nevoie să dăm un rezultat rapid, în urma examenului direct, ne servim de sulfura de sodiu, care a dat satisfacție în toate împrejurările, mai ales în examinarea scuamelor și unghiilor. În scop *didactic*, vom folosi pe rînd: potasa caustică pentru disocierea perilor parazitați de *tricofiție*, cloral-lacto-fenolul cînd avem de-a face cu peri *microsporici* și sulfura de sodiu pentru clarificarea perilor parazitați în *favus*.

EXAMENUL MICROSCOPIC AL PRODUSELOR PATOLOGICE

Pentru examinarea microscopică, materialul recoltat se va depune în centrul unei lame de sticlă șlefuită, bine degresată, peste care se pun 1–2 picături din soluția disociantă folosită, totul acoperindu-se cu o lamelă de sticlă. Excesul de substanță care depășește marginile lamelei se va absorbi cu hîrtie de filtru. Astfel pregătit, preparatul este gata pentru examenul microscopic direct. Toată operația pregătitoare nu durează mai mult de 3–4 minute. Pentru examinarea perilor se va așeza pe lamă un număr suficient de fire de păr, din cele pe care le presupunem parazitate, lăsîndu-se să se disocieze 2–3 minute, necesare clarificării lor. Scuamele sau unghiile vor fi și ele depuse în același mod, însă recoltate din mai multe locuri, pentru motivele arătate mai înainte, iar clarificarea lor trebuie lăsată 10–20 de minute sau chiar mai mult, în funcție de grosimea preparatului. În aceste cazuri putem să grăbim disocierea, apăsînd ușor cu degetul pe lamelă.

Examinarea extemporanee la microscop se face la început cu un obiectiv mai slab (obiectivul 3) și de obicei cu diafragmul închis, la lumina naturală (lumina artificială face preparatele prea refringente, putînd uneori să dea imagini false). Avînd precizată imaginea de ansamblu a prezenţei elementelor micotice, putem să schimbăm obiectivul cu unul mai puternic (7), deschizînd puţin diafragmul şi manevrîndu-l după voie, pentru o cît mai clară detaliere a lor. Examinarea cu imersia nu este necesară.

Se poate întîmpla ca, la o primă examinare microscopică, să nu găsim elemente fungice, deşi leziunea clinică are aspect micotic. Se pregătesc atunci alte preparate din materialul patologic recoltat. În majoritatea cazurilor, repetarea examenului direct este suficientă pentru afirmarea naturii micotice a afecţiunii în cauză, fapt valabil îndeosebi pentru micozele superficiale, cu excepţia poate a celor provocate de ciupercile din grupul *Candida*. Alteori, mai ales în cazurile de micoze profunde, numai însămînţările pe medii de cultură pun diagnosticul de siguranţă.

INTERPRETAREA EXAMENULUI MICROSCOPIC AL FIECĂRUI PRODUS PATOLOGIC

Perii parazitaţi se deosebesc de cei sănătoşi, în cîmpul microscopic, în primul rînd, prin culoarea lor mai închisă şi apoi prin prezenţa elementelor noi pe care le prezintă. Aceste elemente fungice sînt : *filamentele miceliene* şi *artrosporii*. Microscopul ne poate oferi diferite imagini ale perilor examinaţi, în funcţie de modul de parazitare a acestora. Punerea în evidenţă a filamentelor miceliene sau artrosporilor în produsul recoltat este suficientă pentru stabilirea diagnosticului de micoză a pielii capului sau bărbii (aceasta depinde de regiunea de recoltare a perilor) şi a se putea scrie pe buletinul de analiză micologică că s-au găsit peri parazitaţi. Desigur că această constatare este suficientă clinicianului ca să ia măsurile de tratament şi profilaxie corespunzătoare (micozele regiunilor păroase beneficiind în general, de acelaşi tratament, indiferent de tipul clinic sub care se prezintă). Dar acest diagnostic sumar, care nu precizează decît etiologia afecţiunii, nu formează decît primul timp al diagnosticului micologic al perilor, examenul microscopic al acestora permiţînd să se precizeze şi genul sau grupul de ciupercă în cauză.

Parazitarea firului de păr poată să fie de 2 feluri : de tipul *endotrix*, numai înăuntrul perilor şi de tipul *ectotrix*, mai corect ecto-endotrix în care elementele fungice există şi înafara şi înăuntrul firului de păr.

În parazitarea de tip *endotrix* putem găsi două situaţii :

1. Părul este umplut în interior de o masă compactă de artrospori, dînd aspectul unui „sac de nuci". Prin extremităţile rupte ale firului scapă fragmente dispuse în lanţuri, mai greu de observat, cînd părul este puternic pigmentat. Disocierea mai completă a preparatului arată că aceşti spori, ale căror dimensiuni variază între 4 şi 5 μ, sînt în realitate articole miceliene foarte scurte, de formă în general cubică sau sferică, aşezate în lanţuri lungi, şerpuitoare. Aspectul miceliului intrapilar poate oferi două imagini : prima, în lanţuri de elemente dreptunghiulare, solid strînse între ele ; a doua, mătănii formate din elemente rotunjite şi mai uşor de desfăcut. Acest tablou microscopic al parazitării de tip endotrix este caracteristic pentru *părul tricofitic*. Rezultatul examenului micologic se formulează astfel : „s-au găsit peri parazitaţi de un tricofiton endotrix".

2. O altă imagine a parazitării endotrix ne este dată de *părul favic*, care poate să sufere unele variaţii în aspectul lui microscopic, după cum preparatul a fost disociat cu una din cele trei substanţe amintite.

— Cu *potasă caustică*, la o încălzire moderată, se observă, la suprafaţa firului de păr, bule de aer de diverse dimensiuni, iar între ele, filamente miceliene uşor ondulate şi segmentate în articole inegale. La o încălzire mai prelungită, care duce la eliminarea bulelor de aer apărute iniţial, vedem în interiorul părului tuburi miceliene de diferite mărimi, mai subţiri sau mai groase, segmentate la intervale inegale şi ramificate dichotomic sau lanţuri de elemente scurte, de dimensiuni variabile (6 — 8 μ), iar în unele puncte, grupe de artrospori de formă neregulată, aşezaţi ca oasele tarsului (de unde au primit şi denumirea de „tarse favice").

Aspectul părului poate să varieze şi în funcţie de locul examinării lui microscopice : uneori observăm numai tuburi rectilinii sau sinuoase, alteori mai mult lanţuri de elemente cubice.

— Cu *cloral-lacto-fenol*, părul apare traversat în toată lungimea lui de panglici negre, refringente, cu marginea groasă, închisă la culoare, uşor ondulată, întreruptă pe alocuri. Cînd aceste tuburi miceliene sînt numeroase, ele întunecă complet masa firului de păr.

— Cu *sulfura de sodiu*, imaginea prezentată este identică cu cea dată de disocierea prin hidroxidul de potasiu, fără să se vadă însă bulele de aer.

În general, dispoziţia intrapilară nu prea strînsă a filamentelor miceliene explică de ce părul favic este mai puţin fragil decît cel din tricofiţie sau microsporie, fapt care face să se poată păstra mai lung, smulgîndu-se mai greu la tracţiunea manuală.

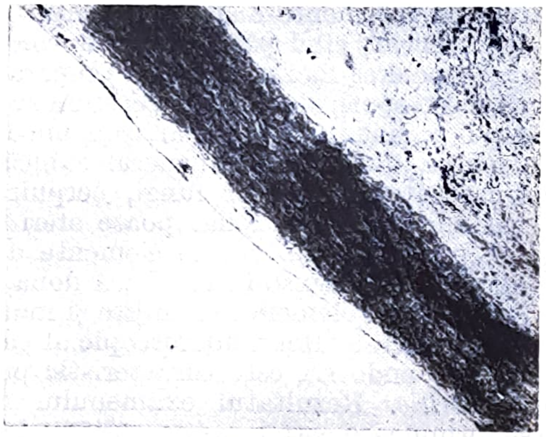


Fig. 440. — Peri parazitaţi de *Trichophyton endotrix*.

Parazitarea de tip *ectotrix* prezintă următoarele imagini microscopice :

1. Firul de păr este înconjurat de o teacă de spori fini (2—3 μ), care formează un manşon continuu, vizibil în diverse planuri, după mişcarea progresivă a obiectivului : întîi apare un mozaic de spori mici care acoperă tot părul, apoi apare teaca acestuia, mărginită de fiecare parte de manşonul sporulat; la urmă, apare partea posterioară a manşonului, care apare suprapusă firului de păr. Sporii nu au nici o dispoziţie regulată, ci sînt lipiţi unii de alţii şi aşezaţi la întîmplare. Dacă prin apăsarea cu degetul a lamelei care acoperă preparatul se striveşte părul, teaca de spori se disociază mai mult şi se rupe în fragmente inegale, ca plăcile de mozaic.

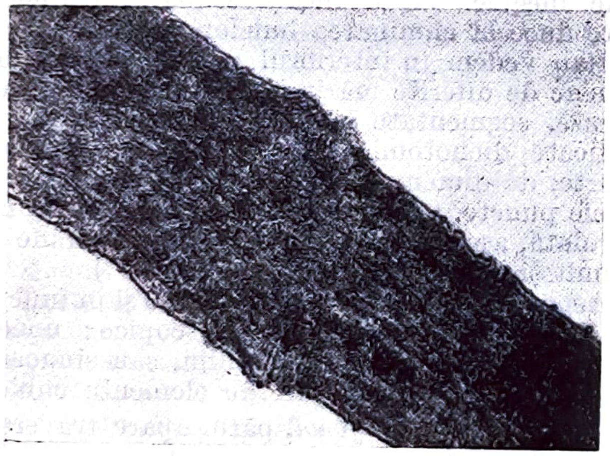


Fig. 441. — Peri favici (obiectiv 3).

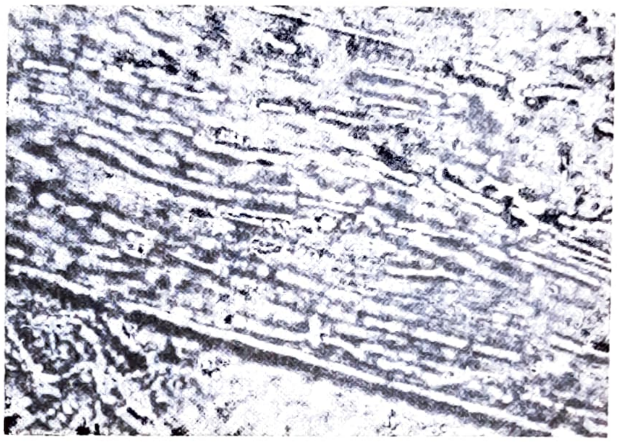


Fig. 442. — Peri favici (obiectiv 7).

Uneori, imaginea descrisă mai sus lipseşte, datorită aplicării locale a unor tratamente, care distrug teaca.

Cînd părul este bine disociat, se observă un miceliu intrapilar format din filamente subţiri, ondulate, în direcţie descendentă, ramificate dichotomic, puţin septate. El dă impresia unui pachet de rădăcini tinere, mici, dezvoltate, într-un tub de sticlă sau un pahar.

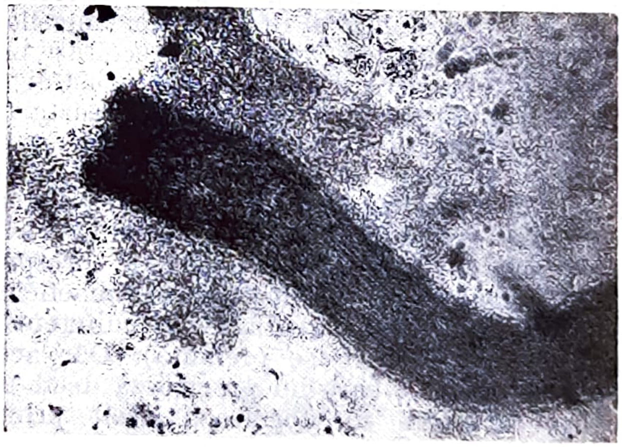


Fig. 443. — Parazitare de tip *Ectotrix* = peri microsporici (obiectiv 3).

Acesta este ***părul microsporic***.

2. O altă imagine de parazitare ectotrix, oarecum asemănătoare cu cea descrisă anterior, este următoarea : perii prezintă de asemenea o teacă de spori fini (tot de dimensiunea 2—3 μ), așezați însă în lanțuri lungi, paralele cu direcția părului. Alături de această teacă se poate observa și un miceliu intrapilar, de un aspect mai polimorf decît cel microsporic. Pe lîngă panglicile ondulate, puțin sau de loc septate, se mai găsesc lanțuri lungi de articole miceliene scurte (absente în microsporie). Această parazitare este caracteristică pentru un *tricofiton microid*. Rezultatul examenului micologic în acest caz se formulează : „s-au găsit peri parazitați de un tricofiton ecto-endotrix microid".

3. Un ultim aspect microscopic al părului parazitat este acela în care observăm lanțuri de filamente miceliene, uneori segmentate, care străbat interiorul părului și îl înconjură sub forma unei teci, formată din spori voluminoși (6—8 μ), rotunjiți sau ovali, uneori cu dublu contur, mai mult sau mai puțin dispuși în lanțuri, în apropiere de marginea firului de păr și diseminați neregulat mai înafară. Avem de-a face în acest caz cu „peri parazitați de un tricofiton ecto-endotrix *megaspor*".

În practică, imaginile microscopice cele mai tipice ne sînt oferite de perii favici, perii microsporici și perii parazitați de un *Tricofiton endotrix*. Pentru tipul ecto-endotrix, delimitarea de tip microid sau megaspor este mai greu de făcut uneori, mulțumindu-ne să vedem despre ce fel de parazitare este vorba.

Specificarea imediată a grupului de ciuperci care parazitează perii este importantă pentru indicarea măsurilor de profilaxie care se impun, în funcție de grupul determinat.

Scuamele sau orice alt element recoltat de pe pielea fără păr oferă, în schimb, imagini microscopice mult mai puțin variate : filamente miceliene mai mult sau mai puțin abundente, mai lungi sau mai scurte, ramificate sau nu, drepte sau sinuoase, uneori septate în segmente dreptunghiulare de lungime variabilă. Nu există o dispoziție precisă a acestor elemente fungice care se pot găsi la examenul microscopic direct al produsului patologic. Punerea în evidență a miceliului, indiferent sub ce formă s-ar prezenta, nu poate să precizeze decît că este vorba de o micoză, de aceea și rezultatul examenului de laborator în acest caz menționează numai că se găsesc filamente miceliene în produsul examinat.

Alteori, la examenul direct al scuamei putem să găsim în loc de miceliul propriu-zis, adevărat, *pseudomicelii* și *celule levurice*, înmugurite, așezate în grupuri (cuiburi) sau izolate. Aceste elemente, caracteristice ciupercilor din grupul *Candida*, pot să existe numai ele în preparat sau pot să coexiste cu filamente miceliene adevărate. În acest caz, rezultatul examenului de laborator va arăta că s-au găsit *pseudomicelii și celule levurice*, sau numai *celule levurice* (în cuiburi sau izolate), sau *filamente miceliene* (uneori este greu de făcut delimitarea reală între miceliul adevărat sau cel fals), și *celule levurice*.

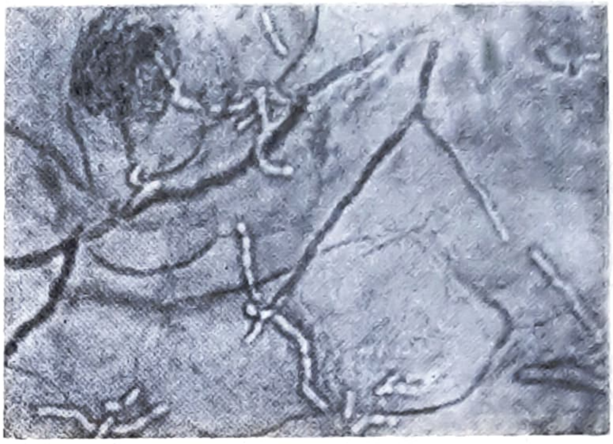


Fig. 444. — Filamente miceliene în scuame.

O imagine mai deosebită pot să o prezinte unele scuame, în care găsim filamente scurte, ondulate, ramificate, ușor fragmentate și ciorchine de spori rotunzi sau ovoizi, îngrămădiți, caracteristici pentru ciuperca *Malasezia furfur* (sinonim : *Microsporum furfur*), agentul etiologic al pitiriazisului versicolor. Aspectul este tipic și nu poate să fie confundat.

Tot în scuame, recoltate îndeosebi din regiunile marilor plici (inghinală, submamară, axilară), mai putem să observăm prezența unor filamente foarte subțiri, numeroase, grupate adesea în fascicule, drepte sau torsionate, care iau aspectul unor bacili în lanțuri. Imaginea este caracteristică pentru *Nocardia minutissima* (sinonim : *Microsporum minutissimum*), denumire pe care o socotim improprie, deoarece *Nocardia minutissima* este un actinomicet aerob, cu elemente în formă de bastonașe, filamente și forme cocoide. Aceasta este imaginea microscopică pe care o găsim în *eritrasmă*.

Cercetări recente au arătat că eritrasma este datorită unor elemente difteroide din genul

Corynebacterium (*Bacillus*), care sînt comensali obişnuiţi în flora bacteriană normală a pielii. Aceştia sînt organisme aerobe, bacili care formează spori şi se aseamănă mult cu *Nocardia minutissima*, primul agent etiologic recunoscut al eritrasmei.

Examinarea unghiilor este în general cea mai laborioasă, unghiile fiind produsele patologice în care elementele micotice sînt cel mai greu de găsit, datorită şi unui proces de autoliză şi transformare degenerativă pe care acestea îl suferă. Aspectul sub care se prezintă parazitul micotic în unghii este acelaşi ca şi în scuame, adică, fie sub forma prezenţei filamentelor miceliene adevărate sau false, fie sub forma cuiburilor de celule levurice, după cum unghia a fost atacată de ciuperci din grupul dermatofiţilor sau din grupul *Candida*. Rezultatul dat va cuprinde specificarea uneia sau celeilalte variante fungice. Preparatele luate din unghii trebuie bine disociate înainte de examinarea lor, dată fiind grosimea stratului cornos al acestui produs.

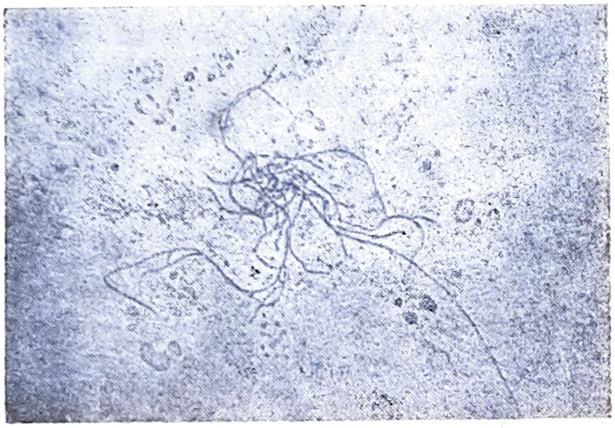


Fig. 445. — Pseudomicelii şi celule levurice în secreţia vaginală (obiectiv 3).

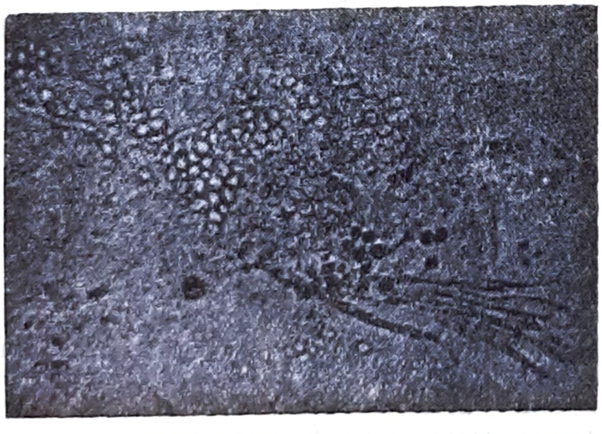


Fig. 446. — Pseudomicelii şi celule levurice în scuame şi exsudat (obiectiv 7).

Puroiul se examinează proaspăt, într-o picătură de ser fiziologic sau din substanţele disociante uzuale. Cercetarea microscopică a puroiului, care în practică se face mult mai rar, pune în evidenţă aceleaşi elemente micotice ca în scuame sau unghii : *filamente miceliene*, de formă şi dimensiuni variabile, sau *celule levurice*, însoţite sau nu de pseudomicelii.

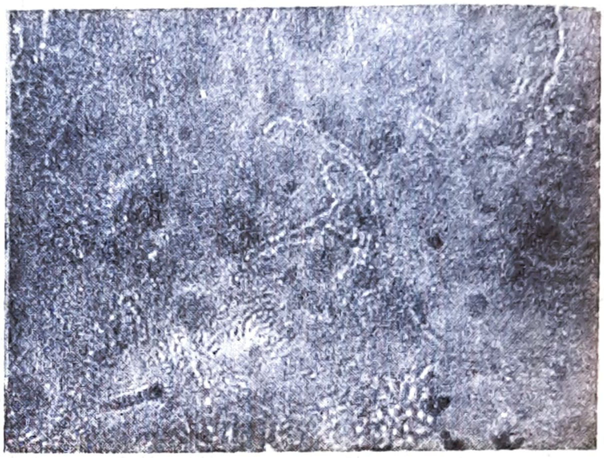


Fig. 447. — Filamente miceliene scurte şi spori de *Malasezia furfur* (*pitiriazis versicolor*).

Dacă în micozele superficiale examenul microscopic al puroiului are mai puţină importanţă, în cele profunde, acesta are un rol deosebit, deoarece puroiul leziunilor fistuloase din aceste cazuri este un vehicul de seamă al grunjilor, care conţin elementele micotice.

Grunjii sînt nişte granulaţii de formă, culoare, consistenţă şi dimensiuni variabile, cu suprafaţa mai mult sau mai puţin regulată şi formaţi dintr-o masă deasă de filamente miceliene încrucişate. Filamentele care formează grunjii pot fi de calibru variabil, în funcţie de agentul patogen. Grunjii actinomiceţilor au diametrul sub 1 μ (microsifonat), pe cînd cei ai ciupercilor adevărate au diametrul de 5—6 μ (macrosifonat).

Cînd aceşti grunji sînt de dimensiuni microscopice (actinomiceţi) ei pot fi descoperiţi numai la examenul direct al puroiului. Grunjii ceva mai mari, de culoare albă-gălbuie, pot să apară prin sfărîmarea lor între 2 lame de sticlă flambate şi răcite. Cei care rezistă la sfărîmare se transportă cu vîrful unui ac de corp străin sau al unui vaccinostil pe o lamă separată, fiind priviți întii cu lupa, după care se pun la disociere, față de care sînt uneori destul de rezistenți. Grunjii mai mari, pietroși, cei *negri* de obicei, nu pot fi supuși disocierii și examenului microscopic decît după o prealabilă fierbere în potasă caustică sau triturarea lor într-un mojar steril. Disocierea grunjilor se face cel mai bine în potasă caustică sau cu glicerină. Examenul lor direct se face fie în stare proaspătă, fie prin colorație (de obicei colorația Gram — aceștia sînt Gram-pozitiv — sau impregnația argentică).

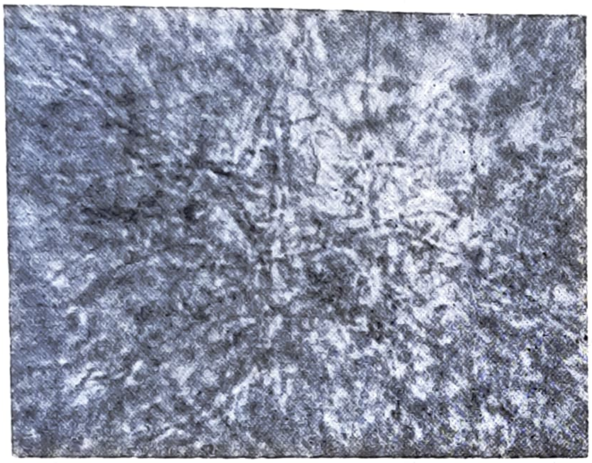


Fig. 448. — Filamente subțiri de *Leptotrix* (depozit amigdalian).

Grunjii examinați microscopic pot prezenta două aspecte: unii sînt formați din filamente subțiri, pînă la 1 μ diametru, neseptate, ramificate, fragmentate uneori în elemente baciliforme sau cocciforme, adesea cu extremitățile libere terminate în formă de măciucă. Acești grunji sînt caracteristici ciupercilor din clasa *actinomicete*, genul *Nocardia* sau *Actinomyces*. Alți grunji sînt formați din filamente miceliene groase, cu diametru de cîțiva microni, septate, unele prezentînd și clamidospori, fiind înglobate într-o substanță interstițială abundentă, ce se disociază extrem de greu. Acești grunji aparțin ciupercilor veritabile, din clasa *fungi imperfecti* sau *ascomicete*.

Examenul microscopic al grunjilor este foarte important pentru precizarea diagnosticului de *micoză profundă* (actinomicoză, maduromicoză), produsă de actinomiceți sau de ciuperci adevărate (după aspectul grunjilor examinați), însă identificarea speciei nu poate fi făcută decît prin izolarea acesteia prin culturi.

Pentru a se pune diagnosticul de micoză profundă, este necesar să se examineze puroiul, din care uneori se poate pune în evidență agentul patologic. Ne vom referi numai la micozele profunde care se pot întîlni în țara noastră. Astfel, în puroiul unor abcese subcutanate sau al unor leziuni ulcerate bănuite că sînt o micoză profundă, se pot găsi corpi rotunzi, mari, cu diametrul de 20—60 μ, cu pereții groși, refringenți, cu conținut omogen sau granulos, umpluți de numeroși endospori mici (2—5 μ). Este imaginea dată de *Coccidioides immitis*, ciupercă care provoacă boala numită *coccidioidomicoză*.

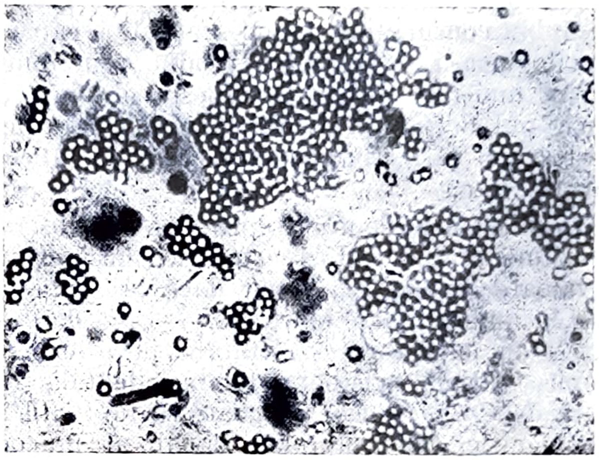


Fig. 449. — Celule rotunde, mici, de *Aspergillus* (aspect din secreție auriculară, obiectiv 7).

Examenul microscopic al exsudatelor (pseudomembrane) și *secrețiilor* leziunilor mucoaselor ne poate oferi următoarele imagini:

a) prezența de celule înmugurite — celule levurice — însoțite sau nu de pseudomicelii sau filamente miceliene adevărate — aspect care ne îndreaptă spre diagnosticul de *candidoză* a regiunii corespunzătoare (cavitatea bucală sau vaginală);

b) uneori examinarea pseudomembranelor aderente recoltate din criptele amigdaliene ne arată o rețea de filamente miceliene foarte subțiri (0,5 μ), nesegmentate, fără ramificații, care la periferie se pot fragmenta în mici elemente cocciforme. Această imagine este caracteristică pentru ciuperca *Leptotrix* (tot din clasa actinomicetelor), destul de frecvent întîlnită în amigdalitele cronice.

Aceleași imagini microscopice ni le poate oferi și examenul direct al *sputei*, care în plus, mai poate să prezinte rareori și tabloul unor filamente miceliene segmentate în celule dreptunghiulare de 4—8 μ, cu marginile mai mult sau mai puțin rotunjite, aspect caracteristic pentru ciupercile din grupul *Geotrichum*. Tot în spută mai putem găsi și prezența unor filamente ramificate, lungi, însoțite de grămezi de spori mici (2—3 μ), rotunzi, de culoare verde-cenușie, care nu înmuguresc și care caracterizează ciuperca *Aspergillus*.

În sfîrșit, examenul microscopic al expectorației ne mai poate oferi imaginea unor elemente levuriforme, caracterizate prin prezența unor celule rotunde sau ovale, cu membrana groasă, cu dublu contur, fiind înconjurate de o capsulă mucilaginoasă și care se reproduc prin înmugurire multipolară. Aspectul este al ciupercii din genul *Cryptococcus*, ale cărei elemente descrise se pot găsi și în puroiul recoltat din abcese subcutanate.

Toate elementele arătate, care se pot observa la examenul direct al expectorației, nu prezintă o valoare diagnostică, decît dacă prezența lor este în număr foarte mare și în special dacă se găsesc în expectorația recoltată prin bronhoscopie. Altfel, existența lor accidentală (în afară de *Cryptococcus*) nu poate să fie luată în considerație, fiind saprofiți banali ai mucoaselor.

Celelalte produse patologice ca urină, materii fecale și unele lichide biologice nu servesc decît extrem de rar examenului direct, fiind folosite mai mult pentru însămînțări pe medii de cultură.

ERORI DE DIAGNOSTIC MICROSCOPIC. DIFICULTĂȚI DE INTERPRETARE

Practica examenului direct al preparatelor micologice poate pune uneori probleme de interpretare mai dificilă a imaginii microscopice, care creează în unele cazuri erori de diagnostic.

Astfel, confuzia care se poate face cel mai des în practică este aceea care ia drept filamente miceliene apariția în scuame sau unghii a așa-numitului „*mozaic fungi*". Acest „*mozaic fungi*", care nu este altceva decît un artefact, de natură încă neprecizată (cristale de colesterol?, produs de dezintegrare a miceliului adevărat?) apare la microscop ca o rețea de tuburi subțiri, ramificate, de calibru neregulat, format dintr-o înlănțuire de elemente clare, refringente, rotunde sau poliedrice, de dimensiuni variabile. Deosebirea de filamentele miceliene veritabile se face (pentru un ochi experimentat) cu destulă ușurință, ținînd seamă de faptul că miceliul regulat al dermatofitului, suprapus celulelor epidermice, nu poate fi confundat cu miceliul neregulat și cu diametrul neuniform al elementelor de *mozaic fungi*, care sînt plasate pe marginile celulelor cornoase.

Mai ușor de diferențiat sînt filamentele miceliene de cristalele lunguiețe de alcali, care pot să apară în materialul examinat și disociat cu potasă caustică, în urma încălzirii lui prea intense. Spre deosebire însă de aspectul uniform al filamentelor miceliene adevărate, aceste cristale au o transparență vitroasă, imagini poliedrice sau neregulate și dispar repede din preparat, dacă se adaugă acestuia o picătură de apă distilată, ușor încălzită.

În ceea ce privește sporii sau celulele levurice, acestea se pot confunda uneori cu picăturile de grăsime, care iau cîteodată o formă rotundă și regulată și care pot să apară în preparat în urma dezagregării lipidice a celulelor. Aceste picături refringente, cu dublă membrană, nu au însă o dispoziție precisă și sînt mai mult izolate, diversitatea mărimii lor fiind foarte deosebită în același preparat.

Toate aceste artefacte, care pot să ducă la o interpretare greșită a examenului direct, falsificînd rezultatul, se deosebesc mai ușor la o examinare atentă a preparatului, îndeosebi cînd acesta este privit la microscop cu un obiectiv mai puternic (obiectivul 7).

EXAMINAREA PREPARATELOR COLORATE

În practica micologică uzuală, colorarea preparatelor nu este folosită, examenul direct în stare proaspătă al produsului patologic fiind de cele mai multe ori suficient pentru punerea în evidență a paraziților micotici. Metodele propuse de diverși autori pentru colorarea dermatofiților nu și-au găsit aplicarea, rezultatele date fiind inferioare celor oferite de examenul microscopic extemporaneu. Singură colorația prin metoda Hotchkiss-McManus s-a dovedit valoroasă în acest caz. Ea se bazează pe proprietatea pe care o are reactivul Schiff de a colora *polizaharizii* conținuți în diverși agenți micotici (componentă care variază între 60 și 90%). Această tehnică, încercată pentru prima dată în micoze în 1950, de Kligman și Mascon, apoi de Gadrat, Bagex și Duque în 1952, după aceea de Muskatblit, Tasdjian și Franke în 1953, iar la noi în țară pusă la punct de Șt. G. Nicolau, Băluș și Avram în 1956, este adaptată în funcție de produsul patologic de cercetat.

Metoda este următoarea:

— fixarea preparatului cu alcool de 70°, timp de 2 minute (pentru produsele cornoase — peri, scuame, unghii — se procedează întîi la disocierea lor prin potasă caustică, apoi se fragmentează în particule mici, care se pun pe lame bine degresate şi unse cu gelatină sau albumină Mayer, după care se usucă la etuvă la 55°, timp de 10—15 minute);

— spălare cu apă distilată;

— introducerea într-o baie apoasă de acid periodic 1%, timp de 5 minute;

— spălare 2 minute la apă curgătoare;

— tratare 10 minute cu reactiv Schiff [1];

— se trece lama prin 3 băi succesive de apă sulfuroasă [2] 5 minute;

— spălare cu apă distilată şi alcool de 95°, 2 minute;

— deshidratare masivă prin alcool absolut, 2 minute şi xilol, 2 minute;

— montare în balsam sau alt mediu.

După cum se vede, tehnica este destul de laborioasă şi se întrebuinţează mai mult pentru colorarea preparatelor din ţesuturile biopsiate, în care vrem să evidenţiem localizarea agenţilor micotici. Prin coloraţia McManus, corpul celular al ciupercii apare vişiniu-intens, ceva mai accentuat la periferie, pe fondul liliachiu al ţesutului parazitat. Se pot distinge foarte clar toate elementele micotice: filamentele miceliene, artrosporii, celulele levurice înmugurite, organele de fructificare etc., mai ales în cazurile în care există vreo îndoială în identificarea lor.

Metoda Hotchkiss-McManus este indicată şi pentru păstrarea preparatelor micotice în colecţie.

DIAGNOSTICUL PRIN CULTURI

NOŢIUNI GENERALE ASUPRA MEDIILOR DE CULTURĂ

Dacă examenul direct al produsului patologic este primul timp al precizării naturii micotice a afecţiunii în cauză, precizarea speciei de ciupercă patogenă, care a provocat-o, nu poate fi făcută decît cu ajutorul *culturilor*. Mediile de cultură folosite în micologie sînt foarte variate şi le-am putea împărţi în două categorii: *medii de izolare* destinate în principiu să favorizeze trecerea de la viaţa parazitară la viaţa saprofită şi permiţînd izolarea majorităţii ciupercilor din patologia umană şi *medii de probă*, destinate dezvoltării caracterelor morfologice tipice ale ciupercii de studiat. La rîndul lor, mediile de probă se pot clasifica în *medii generale* (naturale şi artificiale) şi *medii speciale*, folosite pentru izolarea anumitor grupuri de ciuperci (actinomicete, levuri).

În cele ce urmează, vom căuta să indicăm, pe scurt, compoziţia şi prepararea principalelor tipuri de medii de cultură folosite în practica micologică.

Dintre mediile generale de izolare, cel mai cunoscut şi cel mai întrebuinţat în practica micologică este *mediul Sabouraud*, a cărui compoziţie este următoarea:

— glucoză sau maltoză brută	40 g
— peptonă Chassaigne (sau alta)	1 g
— geloză (agar) în lame (fibre)	2 g
— apă obişnuită	1 000 ml

În lipsa glucozei sau maltozei brute se poate folosi *mierea* în concentraţie dublă (80 g‰).

Metoda de preparare. Se amestecă toate elementele arătate mai sus într-un balon cu fundul plat (geloza poate fi lăsată, înainte cu 24 de ore, să se umfle în apă), se încălzeşte încet în autoclav pînă la 115—120°, se opreşte şi se lasă să coboare temperatura pînă la 100°, cînd se retrage balonul şi se filtrează repede mediul la cald pe vată hidrofilă (un procedeu mai simplu este să se pună toate substanţele la fiert, timp de 1/2 oră, într-o mensură de 1 litru). Se repartizează mediul filtrat în eprubete (cam 8—10 ml într-o eprubetă), cutii Petri sau flacoane Erlenmeyer, după nevoie; se păstrează fiecare tub cu dopuri de vată şi tifon şi se sterilizează la autoclav timp de 20 de minute, urcînd temperatura progresiv pînă la 120°. În acest moment se opreşte încălzirea şi se lasă să se răcească pînă la 100°, cînd se scot eprubetele şi se lasă să se răcească complet, în poziţie înclinată.

La acest mediu se poate scădea cantitatea de glucoză sau maltoză brută la 2% (Langeron), fiind astfel mai propice pentru cultivarea ciupercilor levuriforme.

Pentru împiedicarea dezvoltării saprofiţilor piogeni banali, putem să adăugăm la mediul Sabouraud antibiotice — *penicilină* 5 000 u./ml mediu sau *cloramfenicol* 300 γ/ml, în momentul răcirii sau lichefierii mediului pînă la temperatura de 45—50°. Pentru penicilină se dizolvă 100 000 u. în 10 ml ser fiziologic steril şi se adaugă la fiecare eprubetă — cu o pipetă gradată sterilă — cîte 0,5 ml din această soluţie.

---

[1] *Prepararea reactivului Schiff*: — se dizolvă, în momentul fierberii 1 g fucsină bazică chimic pură, în 120 ml apă distilată;

— după răcire, sub 50°, se adaugă 20 ml acid clorhidric normal şi 1 g bisulfit de sodiu, lăsîndu-se 24 de ore pînă la decolorare.

Acest reactiv se păstrează cel mult o lună, în sticle brune şi la întuneric.

[2] *Prepararea apei sulfuroase*: se amestecă 10 ml bisulfit de sodiu 10% şi 10 ml acid clorhidric normal cu 180 ml apă distilată.

Amestecul trebuie făcut extemporaneu.

Pentru cloramfenicol se prepară o soluţie 1% sterilă — prin dizolvarea conţinutului unui drajeu în 25 ml apă distilată şi sterilizată prin fierbere — din care se adaugă 10 ml la 300 g mediu.

În ultimii ani se întrebuinţează pe scară largă, în laboratoarele de micologie, pentru izolarea selectivă a ciupercilor patogene, medii de cultură la care se încorporează *actidionă* (cyclohexamida) 0,5 mg/ml şi cloramfenicol 0,05 mg/ml. Acţiunea fungistatică a actidionei asupra ciupercilor saprofite se îmbină în mod fericit cu acţiunea inhibitoare exercitată de cloramfenicol asupra contaminanţilor bacterieni, ducînd la mărirea simţitoare a procentului rezultatelor pozitive obţinute prin însămînţări.

Mediul de probă Sabouraud îşi are cea mai largă răspîndire în practica micologică, deoarece permite dezvoltarea aproape a tuturor speciilor de ciuperci patogene. Economicos şi uşor de preparat, acesta nu trebuie să lipsească din nici un laborator.

Dintre celelalte medii generale reţinem *mediile naturale* care se folosesc pentru un studiu mai aprofundat al morfologiei microscopice a ciupercii, ele permiţînd o dezvoltare mai bogată a organelor de fructificare şi a unor forme de rezistenţă, care nu apar totdeauna pe mediile sintetice.

Dintre mediile naturale, cele mai întrebuinţate în practică sînt :

Mediul P.C. (preconizat de Langeron), conţine :

pulpă de cartofi	20 g
pulpă de morcovi	20 g
geloză	20 g
apă	1 000 ml

Metoda de preparare: 20 g cartofi şi 20 g morcovi se lasă la macerat o oră într-un litru de apă, apoi se pun la fiert timp de 5 minute. Se adaugă 20 g geloză, se lasă 2 ore să se umfle şi apoi se pune la autoclav, crescînd încet temperatura pînă la 120°. Se filtrează apoi prin vată hidrofilă la cald, se repartizează în tuburi care se închid cu dopuri de vată tifonată şi se sterilizează la 120°, timp de 15 minute.

Mediul P.C. este foarte frecvent utilizat pentru studiul ciupercilor levuriforme, favorizînd formarea filamentelor, şi mai ales pentru determinarea speciilor din grupul *Candida*. Pentru acest din urmă motiv se mai foloseşte şi *mediul P.C.B.*, care nu este altceva decît acelaşi mediu descris mai sus, la care se adaugă 15% *bilă* proaspătă de bou.

Dintre mediile naturale mai reţinem :

Mediul cu grăunţe de cereale, preconizat de Langeron şi Milotchevici pentru studiul morfologic microscopic al dermatofiţilor. Se folosesc pentru prepararea lui boabe de orz, grîu sau orez, care se depun la fundul eprubetelor, pe un strat de vată gros cam de 2 cm, îmbibat cu apă distilată, pînă la baza stratului de grăunţe. Se sterilizează 20 de minute la autoclav la temperatura de 120°, de 2 ori, la interval de 24 de ore (pentru orezul decorticat o singură dată). În loc de boabe de cereale se poate folosi făina acestora, cel mai folosit fiind, în acest caz, *mediul cu mălai* (care se prepară ca şi mediul Sabouraud), mălaiul înlocuind zahărul, însă fără peptonă. Se recomandă ca sterilizarea acestui din urmă mediu să se facă prin tindalizare şi nu prin vapori sub presiune, în autoclav, pentru ca să nu se provoace hidroliza hidraţilor de carbon.

Mediile de cultură descrise şi în special mediul de probă Sabouraud fac parte din arsenalul de diagnostic al oricărui laborator care se ocupă şi cu studiul general al ciupercilor patogene ele permiţînd izolarea şi, în bună parte, identificarea majorităţii speciilor cunoscute în micologia umană. Există desigur şi alte medii de cultură, mai ales artificiale sau sintetice, preconizate de diverşi autori, care sînt însă folosite mult mai rar în practica micologică. Pentru studiul şi identificarea anumitor grupe mai deosebite de ciuperci este însă nevoie şi de cunoaşterea şi întrebuinţarea unor medii de cultură fără de care nu este posibilă determinarea lor.

Astfel, în identificarea ciupercilor din clasa *actinomicetelor*, se folosesc următoarele medii :

1. Pentru izolarea actinomicetelor *anaerobe* (specie tip : *Actinomyces israeli*, agentul etiologic al actinomicozei) ;

— Geloza profundă (geloza Veillon). Se amestecă bulion de carne[1] sau mai bine bulion de carne şi ficat, 1 000 ml la cald, cu 20 g glucoză şi 80 g geloză, se aduce la pH = 7,2, se repartizează în tuburi şi se sterilizează la 110°, timp de 20 de minute.

Mediul Löffler (ser coagulat). Se amestecă aseptic o parte bulion sterilizat cu 2 părţi ser proaspăt de cal sau bou, se repartizează cu ajutorul unei pipete sterile în eprubete, care se înclină și se sterilizează la etuvă specială (sterilizatorul Koch) 1/2 oră la 75°.

---

[1] *Prepararea bulionului V. f.* (*Viande-foie*) : se amestecă 360 g carne tocată şi 100 g ficat tocat cu 1 800 ml apă, se fierbe şi se adaugă 15 ml HCl pur şi 1 g pepsină, se lasă în baia de apă la 37°, timp de 20 de ore, se încălzeşte la 85°, timp de 10 minute şi se filtrează.

Mediul Tarozzi. Se lasă la macerat timp de 24 de ore 800 g carne de vițel în 1 000 ml apă. Se dizolvă apoi în zeama de carne 10 g peptonă și 5 g clorură de sodiu, după care se filtrează pe hîrtie, la pH = 7,8. Se sterilizează la 120°, timp de 30 de minute, se adaugă 2 g glucoză și se repartizează în tuburi, cîte 25 ml pentru fiecare tub, la fundul căruia se introduce în prealabil cîte un fragment de 1—1,5 cm albuș de ou coagulat. Se adaugă deasupra 2 ml ulei de vaselină și se sterilizează totul la 110°, timp de 20 de minute.

2. Pentru actinomiceții *aerobi* (din genul *Nocardia* sau *Streptomyces*, agenți ai micozelor profunde de tipul micetoamelor), în afară de mediile obișnuite (Sabouraud), pe care se dezvoltă foarte bine, se mai poate folosi :

Mediul cu agar peptonat și glicerinat, a cărui compoziție este : peptonă 10 g, glucoză brută 20 g, glicerină 50 g, geloză 20 g, apă 1 000 ml. Se fierb toate ingredientele împreună, fără glicerină, pînă la dizolvare completă, se filtrează într-un balon, după care se adaugă glicerina și se sterilizează 20 de minute la 110°, apoi se repartizează în eprubete și se înclină.

După prepararea lor, toate mediile de cultură se păstrează la frigider. Mediile prea vechi și uscate nu se folosesc.

Am indicat aici numai mediile de cultură care se folosesc cel mai frecvent în cercetarea micologică și care ne-au dat satisfacție în practica noastră. Pentru studiul mai aprofundat al caracterelor micologice ale ciupercii izolate, ne vom adresa și altor medii, care intră însă în competența micologului propriu-zis.

TEHNICA ÎNSĂMÎNȚĂRII MICOLOGICE

Înainte de a intra în descrierea caracterelor morfologice ale ciupercii izolate, care permit identificarea speciei provocatoare și deci punerea diagnosticului complet al micozei, este necesar să se dea cîteva noțiuni asupra metodei de însămînțare a materialului patologic pe mediile de cultură descrise.

Se recomandă ca însămînțările să se facă la adăpost de curenți de aer (fereastră deschisă, ventilator), care pot risipi materialul, de preferință într-o atmosferă pe cît se poate sterilă (fie prin lampa de ultraviolete, fie sub o boxă specială de material plastic). Vom arăta pe scurt cum se procedează pentru fiecare material patologic în parte.

Perii se fragmentează pe lamă în particule foarte mici, cu o lamă de ras sau cu vîrful unui ac de corp străin, alegînd în special pe cei care ni se par suspecți că sînt parazitați (perii scurți, rupți sau înglobați în grosimea scuamelor). De altfel, acest lucru se poate cunoaște chiar în momentul fragmentării lor, deoarece perii parazitați, fiind foarte fragili, se lasă ușor tăiați, în timp ce perii sănătoși opun rezistență, sărind într-o parte, în momentul cînd încercăm să-i retezăm.

Pentru celelalte produse cornoase — scuame, unghii — se procedează la fel, avînd grijă ca, în acest caz, să fragmentăm porțiuni mai multe și cît mai mici, cunoscută fiind, pe de o parte, dispoziția mai rară în ele a elementelor micotice, iar pe de altă parte, bogăția lor mai mare în germeni banali de suprainfecție.

Dacă se întîmplă uneori, în cazul perilor, să nu avem la îndemînă decît un singur fir de păr parazitat, descoperit la examenul direct și nu mai putem recolta alții, atunci se procedează imediat la spălarea lui într-o soluție de ser fiziologic steril, pentru înlăturarea urmelor substanței disociante și însămînțîndu-l ca atare, după fragmentarea lui.

Deoarece materialul patologic care se însămînțează este în general încărcat cu o serie întreagă de microorganisme de suprainfecție, unii autori au recomandat în prealabil tratarea lui cu diverse substanțe dezinfectante (sublimat, formol, acizi minerali etc.) și apoi însămînțarea acestuia. În practică, acest procedeu este laborios și nu se aplică. Astăzi se preferă însămînțarea materialului direct pe mediul de cultură cu antibiotice (penicilină, cloramfenicol) sau mai bine cu actidionă și cloramfenicol, care permit în multe cazuri obținerea unor culturi pure.

Materialul astfel pregătit pentru însămînțare se ridică cu vîrful ansei de platină, trecută în prealabil prin flacără și se depune pe suprafața mediului de cultură (mediul solid Sabouraud) în puncte diferite, separate cam la distanță egală unul de altul (3—4 fragmente pentru un tub). Înainte de a ridica fragmentele de material patologic, vîrful ansei (care trebuie să fie îndoit în unghi drept) este răcit, introducîndu-l pînă în fundul eprubetei în lichidul de condensare. Toată operația însămînțării (flambarea ansei și răcirea ei, ridicarea materialului, depunerea lui, trecerea dopului de vată care închide eprubeta și flambarea gîtului acesteia după astupare) nu trebuie să dureze mai mult de 40—50 de secunde.

Prelungirea ei nu face decît să se înmulţească posibilităţile de contaminare din exterior. Pentru aceleaşi motive se şi recomandă să se însămînţeze un număr cît mai mare de tuburi, mai ales în cazul scuamelor şi unghiilor. În practică este preferabil să se însămînţeze : perii pe 2—3 tuburi (mai multe pentru cei recoltaţi din leziunile supurate); scuamele pe 4—5 tuburi, iar unghiile pe 8—10 tuburi. Pentru peri, este mai bine să se însămînţeze astfel : perii microsporici şi cei tricofitici de tip endotrix pe 1—2 tuburi; perii cu *Tricofiton microid* pe 3—4 tuburi; perii favici pe 3—4 tuburi; perii cu *Tricofiton megaspor* pe 6—8 tuburi.

Produsele patologice semisolide sau lichide se pot însămînţa, fie cu ansa, fie mai bine cu ajutorul unui tampon de vată steril, ca cel folosit la recoltarea exsudatelor faringiene.

Astfel, depozitele din cavitatea bucală (limbă, amigdale), precum şi secreţia vaginală, care se recoltează cu tampoanele sterile, se însămînţează direct pe mediile de cultură solide, prin trecerea tamponului în striuri la suprafaţa mediului. La fel se procedează şi pentru spută. O menţiune specială trebuie făcută pentru materiile fecale, care sînt lăsate la macerat timp de 24 de ore într-o soluţie de ser fiziologic amestecat cu antibiotice (penicilină şi streptomicină) şi apoi însămînţate.

Însămînţarea *urinii* şi a altor lichide patologice se face de obicei pe mediile lichide, prin depunerea unei cantităţi reduse în mediu, de 1—2 ml din produsul patologic, cu ajutorul unei pipete Pasteur sterile.

Mai delicată este însămînţarea *puroiului* şi a elementelor pe care poate să le conţină. În cazul micozelor supurate, localizate la regiunile păroase ale pielii capului şi feţei sau pe pielea glabră, sau în leziunile din jurul unghiilor (perionixis), însămînţarea se face direct cu ajutorul ansei de platină, care ia picătura de puroi şi o depune la suprafaţa mediului de cultură, în puncte diferite, sau în striuri. Se foloseşte de preferinţă, în aceste cazuri, mediul Sabouraud cu antibiotice.

Pentru puroi, secreţii, spută, urină, 2—3 tuburi de însămînţare sînt suficiente pentru un bolnav.

Însămînţarea devine ceva mai complicată cînd avem de-a face cu o *micoză profundă*. Folosirea mediilor selective este aici în funcţie de tipul de ciupercă pus în evidenţă la examenul direct al grunjilor, în cazul cînd aceştia au putut fi descoperiţi şi recoltaţi.

În general, pentru orice tip de grunji, se recomandă înainte de însămînţarea lor pe mediile alese, ca să fie spălaţi (în cutie Petri sterilă) timp de aproximativ o oră în ser fiziologic sau apă distilată, sterile, la care se adaugă de la caz la caz (pentru grunjii negri mai ales) un antibiotic cu spectru larg de acţiune, pentru distrugerea eventualei flore microbiene asociate. După spălare se trece la însămînţarea lor pe mediul ales prin ridicarea lor cu vîrful ansei, fie direct din cutia Petri (aşezată pe un fond negru, pentru a distinge mai bine grunjii mici de culoare deschisă — albă sau gălbuie), fie de pe lama de sticlă sterilă pe care au fost depuşi. Grunjii foarte mici se însămînţează ca atare, cîte 2—3 pe un tub; cei mai mari se pot fragmenta.

Este bine să se însămînţeze un număr cît mai mare de tuburi (15—20), deoarece parte din grunji pot să fie sterili, nedezvoltînd cultura dorită.

În cazul actinomicetelor *anaerobe* (din actinomicoza clasică cervicofacială, pulmonară sau abdominală), grunjii de culoare gălbuie vor fi însămînţaţi în mediul Tarozzi, în geloză profundă şi, eventual, pe mediul Löffler. Rezultatele cele mai bune se obţin cu mediul Tarozzi şi mediul Veillon, în condiţii de anaerobioză parţială (microaerofilie). Aceasta se realizează însămînţînd grunjii în profunzimea gelozei, lichefiată la baia de apă şi imediat după răcirea ei, înainte de solidificare şi apoi se agită tubul, pentru a asigura repartiţia fragmentelor de grunji în masa gelozei lichide.

Pentru actinomicetele *aerobe* (din micetoame) şi pentru ciupercile adevărate (din micetoamele fungice — maduromicoze), grunjii se vor însămînţa pe mediul Sabouraud (o parte pe medii cu antibiotice, o altă parte pe medii fără), pe mediul cu agar glicerinat şi pe mediul P.C.

Sînt cazuri de astfel de micoze profunde cînd grunjii nu au putut să fie descoperiţi, fie din cauza eliminării lor intermitente (care poate să varieze de la 3 la 6 săptămîni şi chiar mai mult), fie datorită dimensiunii lor microscopice, care împiedică să fie observaţi la examinarea obişnuită. În astfel de situaţii se poate recurge la însămînţarea unui fragment de ţesut biopsiat, care este triturat într-un mojar steril şi apoi trecut în particule foarte mici pe mediul corespunzător.

După însămînţarea materialului patologic pe mediul de cultură se pune problema păstrării tuburilor însămînţate. În general, cea mai mare parte din ciupercile patogene au capacitatea să se dezvolte în condiții bune la temperatura înconjurătoare, adică la temperatura camerei. Cum aceasta poate să varieze, de la un laborator la altul, este bine de știut că temperatura care le convine cel mai bine agenților micotici este în jurul a 25°. Există unele specii însă (din genul *Aspergillus*), care se dezvoltă mai bine la 37°, iar altele care nu cresc la această temperatură. În sfîrșit, trebuie să se țină seama, că există uneori diferențe importante de aspect macro- și chiar microscopic între coloniile dezvoltate la 37° și cele crescute la temperatura camerei, fapt care trebuie să se ia în considerație pentru determinarea speciei în cauză. De aceea, în practica curentă, este bine totdeauna să se păstreze o parte din tuburile însămînțate la termostat la 37°, iar restul le vom lăsa la temperatura de 28°, sau a camerei.

CRITERII DE STABILIRE A DIAGNOSTICULUI PRIN CULTURI

Identificarea unei specii de ciuperci patogene se face prin studierea caracterelor macro- și microscopice, pe care le prezintă colonia dezvoltată pe diferite medii de cultură. Din acest punct de vedere trebuie să se țină seama de durata dezvoltării culturii, care variază de la o specie la alta și care trebuie urmărită pe o perioadă destul de îndelungată, pentru a se putea trage concluziile definitive în aprecierea trăsăturilor ei caracteristice. Sînt unele elemente, atît la aspectul macro-, cît mai ales microscopic al coloniei, care nu apar decît la un interval relativ îndepărtat de la însămînțare, cînd cultura a atins deplina ei maturitate, și care nu trebuie neglijate în stabilirea diagnosticului. Dacă în practica curentă, eprubetele de 180/18 mm folosite pentru însămînțare permit, în general, o dezvoltare mulțumitoare a unei culturi, există cazuri cînd colonia este limitată în expansiunea ei în aceste tuburi și atunci trebuie să se recurgă la obținerea de colonii gigante, mai demonstrative, în flacoane Erlenmeyer de 200—300 cm³.

În aprecierea caracterelor *macroscopice* se va ține seama de: aspectul suprafeței coloniei (strălucitoare sau mată, prăfoasă, pufoasă etc.) și relieful ei (centrul ridicat sau deprimat, radiat sau cerebriform), culoarea, atît a suprafeței, cît și a reversului, prezența unui pigment difuzibil în mediu, durata dezvoltării, consistența coloniei (friabilă, păstoasă, cremoasă). Dacă în multe cazuri, aspectul macroscopic al culturii ne poate furniza o parte din datele necesare pentru identificarea speciei (de exemplu, în cazul grupului *Candida*), studiul micologic al acesteia nu se poate concepe decît pe baza completării cu tabloul morfologiei ei microscopice. Aceasta în special pentru speciile care pot să prezinte cam aceleași aspecte macroscopice, cum este cazul unora dintre dermatofiți. De altfel, caracterele microscopice ale coloniei în cultură au fost criteriile care au permis unor cercetători din domeniul micologiei, elaborarea unor clasificări sistematice a ciupercilor studiate.

Pentru observarea și studierea particularităților microscopice ale unei culturi se recoltează, la anumite intervale de la însămînțare, un mic fragment din colonia dezvoltată și se examinează la microscop, între lamă și lamelă, după disocierea lui într-o picătură de potasă caustică sau cloral-lacto-fenol.

Recoltarea fragmentelor dorite se face cu vîrful ansei de însămînțare sterilizată prin flambare, din diferite sectoare ale coloniei, atît de la suprafață, cît și din profunzime.

Datele astfel obținute la microscop sînt suficiente, în majoritatea cazurilor, pentru aprecierea particularităților caracteristice. În cercetarea micologică, studiul complet al caracterelor microscopice ale culturii se face de obicei prin metoda însămînțărilor în *picătură suspendată*, preconizată încă din 1873 de van Tieghem și de Monnier. Această metodă, căreia Sabouraud i-a adus unele modificări și care constă în însămînțarea unui fragment minim de cultură într-o picătură de mediu ales, suspendată pe fața inferioară a unei lamele depusă pe un inel de sticlă aderent de o lamă, permite observarea zilnică (și deci studierea) a dezvoltării coloniei și elementelor ei microscopice. Descrierea tehnicii culturilor în picătură suspendată aparține specialității strict micologice și nu vom intra în amănunte asupra ei.

Trebuie menționat totuși că particularitățile macro- și microscopice ale unei culturi nu constituie totdeauna criterii absolut sigure de apreciere a determinării speciei în cauză, ele trebuind să fie completate, în unele cazuri, și cu alte mijloace ajutătoare ale diagnosticului micologic; aceasta deoarece există multe trăsături comune, din acest punct de vedere, între o specie și alta — cum vom vedea la dermatofiți — fapt care îngreunează identificarea lor, în absența altor mijloace de diagnostic. Din această cauză, încă nu s-a ajuns, nici la ora actuală, la o clasificare raţională, bazată pe criterii sigure, a acestor ciuperci.

Înainte de a intra în *interpretarea* caracterelor macro- şi microscopice ale culturilor este necesar să se dea cîteva noţiuni sumare asupra elementelor de morfologie microscopică, care pot să apară în dezvoltarea coloniei. Vom face aceasta pe rînd pentru principalele categorii de agenţi micotici mai frecvent întîlniţi în practică.

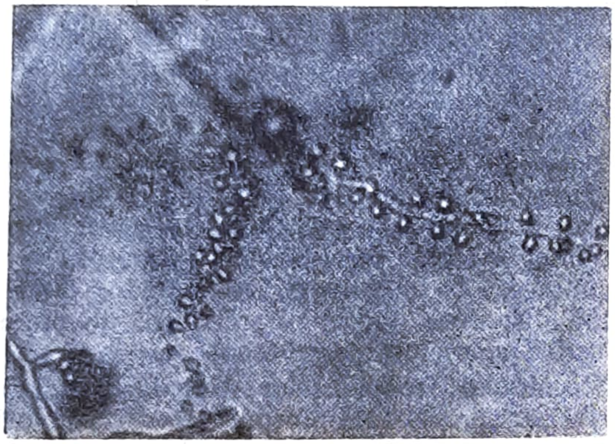


Fig. 450. — Aleurii dispuse în *„acladium"*.

Astfel, pentru *dermatofiţi*, ciupercile întîlnite cel mai frecvent în etiologia micozelor superficiale, putem să întîlnim următoarele elemente microscopice, care formează în ansamblul lor organele de fructificare :

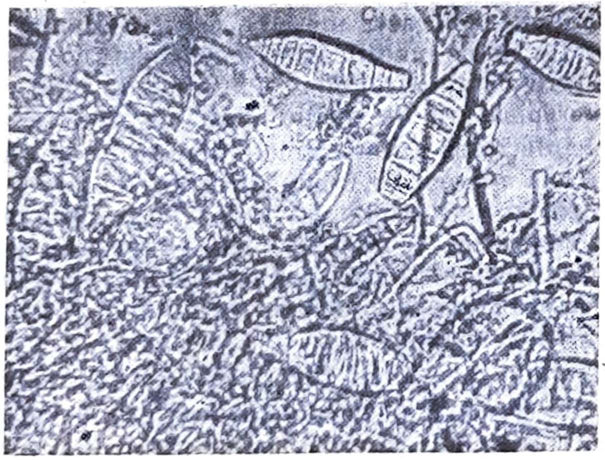


Fig. 451. — Fusuri ascuţite la capăt (tip microspor).

— *Aleuriile* sau *aleurosporii*, mici elemente celulare de 3 μ, de formă rotundă, piriformă sau ovoidă, legaţi de miceliu direct sau prin intermediul unui mic pedicul. Dispoziţia lor poate să fie izolată, în spic (*acladium*) sau în ciorchine. Se întîlnesc în mare număr la unele specii de dermatofiţi, formînd la suprafaţa coloniilor acestora un fel de depozit făinos (de unde şi numele de „aleurie" — din greceşte : *aleuron* = făină).

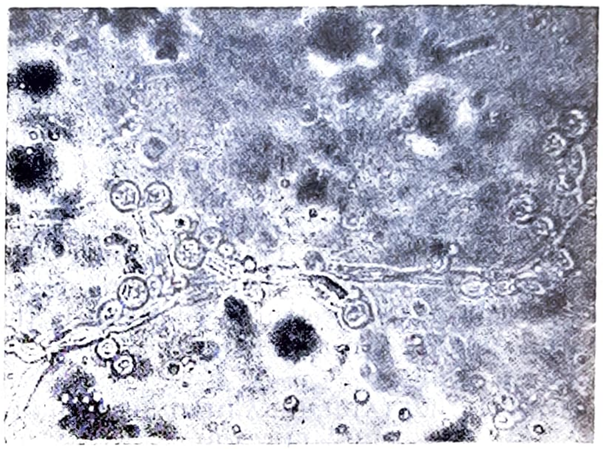


Fig. 452. — Clamidospori veritabili (din cultură de *Candida albicans* pe mediul P.C.).

— *Fusuri* (zise şi *closterospori* sau *macronidii*), formaţii fuziforme, care se dezvoltă, fie la capătul unui filament micelian, fie pe una din laturile acestuia. De mărime şi formă variabilă (cu capătul liber rotunjit sau ascuţit), aceste fusuri sînt împărţite într-o serie de cămăruţe sau „loji" (3—10) prin nişte pereţi transversali. Se pot găsi, ca şi aleuriile, izolate sau mai multe pe aceeaşi ramură miceliană (în buchet).

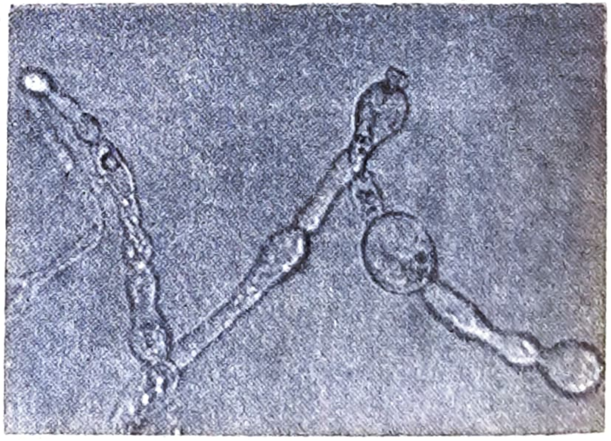


Fig. 453 A. — Miceliu în rachetă şi falşi clamidospori.

— *Clamidosporii* sînt elementele sporifere cele mai răspîndite la ciuperci. În general, se rezervă numele de *clamidospori* oricărui spor voluminos, de formă rotundă, cu citoplasma foarte densă (încărcată cu materii de rezervă și mai ales lipide) și peretele celular foarte gros, cu dublu contur de aspect refringent. Acesta este *clamidosporul veritabil*, care trebuie totuși deosebit de anumite formațiuni celulare, de dimensiune anormală, cu peretele subțire și conținut rar sau absent și care nu sînt altceva decît niște articole miceliene, forme de rezistență ale culturilor, care pot să apară foarte frecvent în coloniile dermatofiților. Clamidosporii pot să fie *terminali*, la extremitatea unui filament, sau *intercalari*, între două ramuri filamentoase. Uneori se pot găsi și clamidospori *în lanțuri*.

— *Organe nodulare* — niște formațiuni constituite dintr-o împletitură strînsă de filamente miceliene, simple sau multiple, care au fost interpretate de numeroși autori ca un început al unui proces de fecundare.

Mai trebuie menționat că însuși aspectul microscopic al miceliului în mediul de cultură poate să varieze, el putîndu-se prezenta uneori sub forme diverse ca : *micelii în rachetă* (un miceliu septat, ale cărui articole alungite prezintă la extermitatea distală niște dilatații în formă de măciucă, ca la o rachetă), miceliu ramificat în *coarne de cerb*, miceliu *denticulat* (ca dinții unui fierăstrău), miceliu *în candelabru*, miceliu în *spirală* sau *vrilă* etc. Miceliul în vrilă are extermitatea liberă rulată în formă de spirală, mai mult sau mai puțin strînsă, ca un arc de somieră.

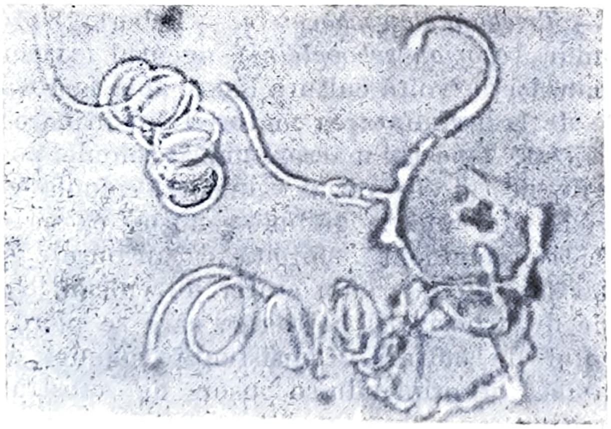


Fig. 453 B. — Spirale sau vrile.

Sîntem de părere că nici unul din elementele morfologiei microscopice ale culturilor de dermatofiți, care au fost descrise, nu poate să fie apreciat ca fiind strict specific, pentru o specie sau alta de dermatofit. De aceea și clasificările botanice care au luat drept bază pentru sistematica dermatofiților aceste elemente nu pot să rămînă în picioare.

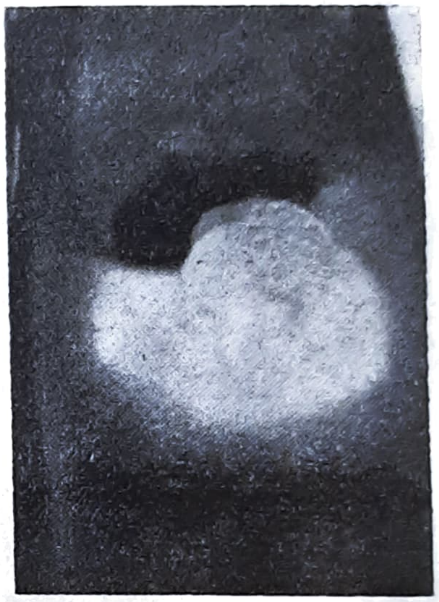


Fig. 454. — *Tricophyton violaceum* (cultură în tub pe mediul Sabouraud). Se observă apariția pigmentului violet în partea superioară a coloniei.

Credem că nu este cazul să enumerăm aici toate sistemele de clasificare care au fost propuse pentru acest grup de ciuperci. Trebuie să arătăm însă că încă nu există o clasificare unitară, bazată pe criterii științifice, bine conturate. Pentru o studiere mai sistematizată a speciilor de dermatofiți care se întîlnesc în practica micologică și în lumina ultimelor cercetări asupra originii acestora, vom adopta, pentru moment, o clasificare a lui Ajello. Acesta împarte dermatofiții în funcție de gazda lor primară, care servește în același timp și ca sursă de contaminare, după cum urmează :

1. Dermatofiți *antropofili*, a căror sursă este omul.
2. Dermatofiți *zoofili*, care recunosc drept gazdă primară animalul.
3. Dermatofiți *geofili*, care sînt de obicei saprofiți ubicvitari ai solului și numai accidental pot să devină paraziți ai omului sau ai animalului. Această grupă este mai recent intrată în nomenclatura dermatofiților.

Vom căuta să redăm mai jos cîteva din criteriile macro- și microscopice mai importante, care ar permite identificarea principalelor specii de dermatofiți, luînd ca specii tip acelea care recunosc o serie de caractere comune și care se întilnesc mai frecvent în practică. În denumirea speciei vom ține seamă de nomenclatura actuală, admisă de majoritatea micologilor. În același timp vom menționa alăturat sinonimele atribuite în decursul timpului.

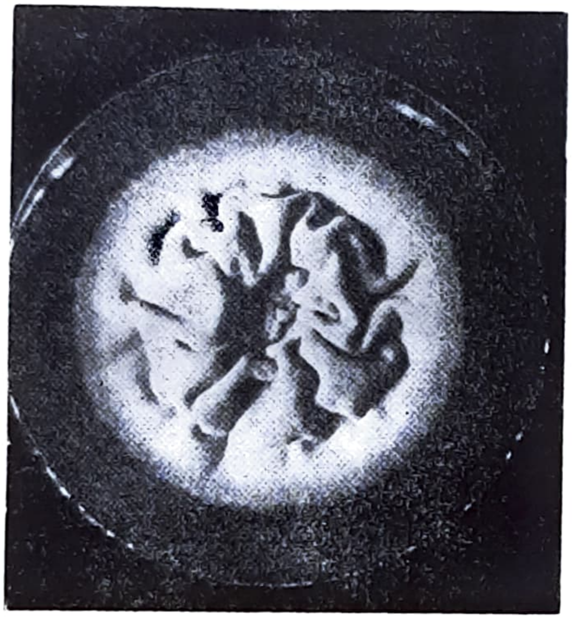


Fig. 455. — Trichophyton crateriformae (cerebriformae) — cultură în flacon Erlenmeyer.

I. Dintre *dermatofiții antropofili* fac parte:

— *Trichophyton violaceum* — Bodin, 1902 (sinonime: *Tr. glabrum*, *Achorion violaceum*) este la noi în țară, agentul micotic cel mai frecvent al tricofiției superficiale a pielii capului, atît la copil, cît și la adult. La acesta din urmă poate să determine apariția tricofiției cronice. Acest dermatofit provoacă cam 1/3 din cazurile de leziuni micotice ale unghiilor la adult. E mai rar izolat din tricofițiile superficiale ale bărbii și pilomicoze de tip supurat.

Trichophyton violaceum este una din speciile ce se recunoaște cel mai ușor, pe baza pigmentului caracteristic, de culoare violetă, care apare în centrul coloniei, pe măsura dezvoltării ei, prinzînd cu timpul toată suprafața culturii. Pe mediile obișnuite (mediul Sabouraud), cultura se dezvoltă încet, cam după 7—10 zile de la însămînțare, atingînd după 2—3 săptămîni un diametru de 1—2 cm. Ușor proeminentă, lucioasă, de consistență asemănătoare pielii, aderentă de mediul nutritiv, cultura poate să apară de la început pigmentată sau nu, existînd și colonii lipsite de pigment. Nu prezintă nimic caracteristic din punctul de vedere al aspectului microscopic, fiind în general o cultură săracă în organe de fructificare.

— *Trichophyton tonsurans* — Malmsten, 1845 (sinonime: *Tr. crateriforme*, *Tr. cerebriforme*, *Tr. flavum*, *Tr. sulfureum*, *Tr. plicatile* etc.). Această specie este de obicei întîlnită în tricofițiile superficiale ale bărbii și ceva mai rar, în cele ale pielii capului. Mai rar este izolată din tricofițiile supurate ale ambelor regiuni și cu totul rar pe pielea glabră. Se prezintă sub aspectul unei colonii fin prăfoasă, de culoare ușor gălbuie, cînd este privită prin transparență, destul de aderentă de mediu și care poate să ia înfățișări destul de variate (uneori cu centrul deprimat în formă de crater, alteori prezentînd o serie de circumvoluții care merg pînă la periferie), de unde și variatele denumiri care i s-au dat. Cultura se dezvoltă relativ repede, cam după 5—6 zile de la însămînțare, luînd aspectul tipic descris mai sus, la aproximativ 2—3 săptămîni.

Din punct de vedere microscopic, imaginea cea mai frecvent întîlnită este a unui număr mare de aleurii așezate în spice sau în ciorchine compuse, compacte, avînd formă variabilă. Rareori se găsesc prezente fusuri alungite, neregulate, cu perete subțire.

— *Trichophyton schoenleini* — Lebert, 1845 (sinonim *Achorion schoenleini*), agentul favusului uman, își dezvoltă cultura încet, abia la 10—15 zile de la însămînțarea materialului în care s-a localizat. Aspectul macroscopic al coloniei poate să fie destul de variat: uneori, colonia este netedă, de culoare gălbuie-cenușie, ca ceara; alteori proeminentă, zbîrcită, ca un burete, sau chiar deprimată ca un crater de vulcan, cu o serie de arborizații periferice care se pierd în mediul de cultură. Consistența coloniei este friabilă, desprinzîndu-se ușor de substratul nutritiv.

Morfologia microscopică este și aici săracă (doar filamente miceliene și așa-zișii clamidospori), uneori însă prezentînd anumite aspecte mai particulare, care privesc terminațiile miceliului și care, din această cauză, au primit denumiri ca: miceliu în candelabru, în coarne de cerb etc.

— *Trichophyton rubrum* — Castellani, 1909 (sinonime *Tr. purpureum*, *Tr. rubidum*, *Tr. multicolor*, *Epidermophyton rubrum*, *Epidermophyton plurizoniforme* etc.) este un dermatofit cu largă răspîndire în întreaga lume și care a început să fie izolat în ultimii ani și în țara noastră. Agent patogen al celor mai variate tipuri de afecțiuni micotice ale pielii glabre din orice regiune a corpului, el se izolează îndeosebi din leziunile de epidermofiție plantară și palmară (mai ales cele de tip uscat), asociate în cea mai mare parte a cazurilor și cu onicomicoze. Se izolează de asemenea din leziunile intertriginoase ale plicilor inghinocrurale (*eczema marginatum*), precum și din alte leziuni, aspectul clinic putînd să îmbrace forme foarte variate. Afectarea regiunilor păroase este mult mai rară, fiind semnalat în tricofiții superficiale sau mai profunde ale bărbii și mai rar ale pielii capului.

Aspectul microscopic al coloniilor poate să fie de două feluri : a) o formă pufoasă, albă, ca un disc reliefat, înconjurat de o zonă periferică de puf fin; *b*) o formă granulară, fin prăfoasă, albă la început, care își schimbă destul de repede culoarea, prin apariția unui pigment roșu viu, ca purpura. Acesta poate să apară mai întîi în porțiunea cea mai adîncă a coloniei, ajungînd să cuprindă și restul ei, spre suprafață. Uneori se limitează numai la anumite sectoare, cu nuanțe variate, în zone concentrice, de la galben, mov, roz, roșu etc. De cele mai multe ori, pigmentul apare mai roșu pe mediul cu mălai.

Din punct de vedere microscopic, cultura nu are nimic caracteristic, în afară de prezența filamentelor miceliene ramificate, segmentate uneori în articole scurte. Se pot întîlni aleurii piriforme, în acladium, la început puține, treptat mai numeroase. Sînt tulpini care pot să aibă și fusuri (scurte, ușor rotunjite la capăt, cam rudimentare). Acestea se găsesc în special la forma granulară, la care și aleuriile sînt mai frecvente.

Cele 4 specii descrise din genul *Trichophyton* parazitează părul după tipul endotrix (numai înăuntrul lui), cu excepția poate a *Tr. rubrum*, care determină numai foarte rar o parazitare pilară.

Tot în această grupă a tricofitonilor antropofili ar trebui să descriem și specia *Trichophyton interdigitale* (mai corect numit poate *Epidermophyton interdigitale* — Kaufman-Wolf), dată fiind stricta ei localizare numai la pielea glabră. Însă, majoritatea micologilor o socotesc doar o variantă a unei alte specii, *Trichophyton mentagrophytes*.

— *Microsporum audouini* — Gruby, 1843 (sinonime : *M. depauperatus*, *M. umbonatum*, *M. tardum*, *M. helveticum* etc.) este agentul cel mai frecvent izolat în țara noastră din microsporia uscată a pielii capului. Aceasta este specia care deține primul loc în scara dermatofiților din R.P.R. Ea provoacă cele mai multe epidemii în colectivitățile de copii (creșe, cămine, internate, școli, preventorii, sanatorii etc.). A fost izolat mai rar de pe pielea glabră și foarte rar din leziunile supurative.

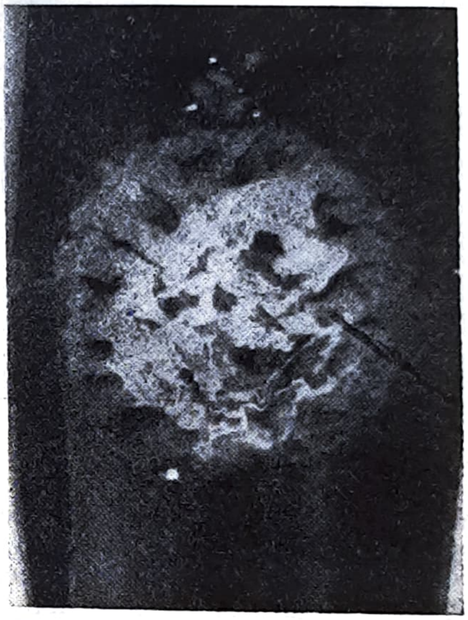


Fig. 456. — *Trichophyton* (*Achorion*) *schoenleini* — cultură în tub, pe mediul Sabouraud.

Apariția culturii se observă la aproximativ 5—6 zile de la însămînțare, aspectul caracteristic luîndu-l abia peste 10—14 zile. Colonia are aspect pufos scurt, de culoare ușor roz, cu un mic buton central, de la care pleacă, în dezvoltare, o serie de brazde radiare spre periferie.

Tabloul microscopic este destul de uniform : filamente miceliene puțin segmentate, unele în formă de rachetă, aleurii rare, cîteodată clamidospori.

— *Microsporum ferrugineum* — Ota, 1922 (sin. *Trichophyton ferrugineum*, *Microsporum japonicum*) este o specie cu o distribuție geografică mai limitată. Originară și endemică în Extremul Orient (China, Coreea, Japonia), a fost transportată după al doilea război mondial spre vest, ajungînd și la noi în țară, unde a provocat chiar focare epidemice de o virulență deosebită. Se izolează mai ales din microsporii ale pielii capului, mai rar din leziuni cutanate.

În culturi este ușor de recunoscut pe baza culorii caracteristice, galbenă-portocalie sau roșie-închis, ruginie, a coloniei. Consistența coloniei este de aspectul pielii, lucioasă, uneori cu centrul ridicat, în formă de cupolă, dar putînd să ia cîteodată și aspecte mai variate, care pot să simuleze cultura de *Trichophyton schoenleini*. Dat fiind că structura microscopică nu are nimic caracteristic, fiind o cultură cu morfologie săracă, diagnosticul acestei specii se pune, în majoritatea cazurilor, pe aspectul macroscopic descris. Microscopic, prezintă un miceliu septat, de culoare gălbuie-portocalie, ramificat, uneori cu umflături terminale, în formă de rachetă. Se observă de asemenea numeroși falși clamidospori, terminali sau intercalari, de formă variată. Rareori se găsesc aleurii.

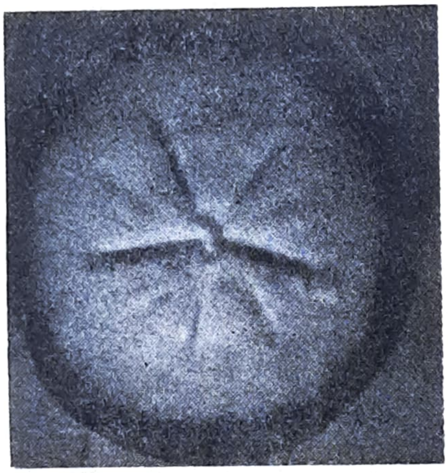


Fig. 457. — Microsporon audouini — cultură în flacon Erlenmeyer.

— *Epidermophyton floccosum* — Harz, 1870 (sinonime: *Epidermophyton cruris*, *Epidermophyton plicarum* — Nicolau, 1913, *Trichophyton inguinalis*, *Epidermophyton clypeiforme*). Se izolează cel mai frecvent din leziunile pielii regiunii inghinocrurale, dar și din alte regiuni ca spațiile interdigitale de la picioare. Este izolat mai rar din leziuni de epidermofiție plantară sau palmară și din unghii sau leziuni cutanate localizate pe gambe, fese, trunchi.

Cultura este fin prăfoasă, de culoare galbenă, la început netedă și mai apoi cutată, chiar de aspect cerebriform. Se dezvoltă destul de repede, la 5—6 zile de la însămînțare. Identificarea se face cel mai ușor prin cercetarea microscopică a unei porțiuni de cultură, care ne pune în evidență prezența *fusurilor* caracteristice, în formă de măciucă, cu cîte 4—5 loji grupate în buchete, de obicei cîte 4—5 sau mai multe la un loc, ca *bananele*. Aleuriile lipsesc cu desăvîrșire. Rareori prezintă spire. În culturile vechi se observă falși clamidospori.

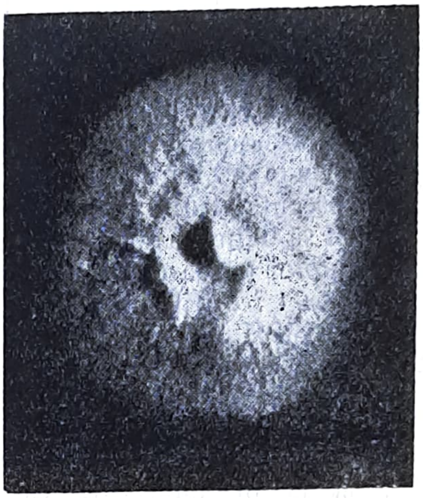


Fig. 458. — Microsporon lanosum — cultură în flacon Erlenmeyer.

Nu am epuizat toată gama dermatofiților antropofili, ci am prezentat pe cei care se întîlnesc la noi în țară sau sînt recunoscuți ca avînd o răspîndire mai largă în toată lumea. În afară de acestea, mai sînt specii care, datorită unei distribuții geografice mai limitate, rarității sau unei descoperiri cu totul recente, vor fi numai menționate. Astfel cităm:

— *Trichophyton concentricum*, care provoacă boala numită *Tokelau*, o erupție formată din leziuni de cercuri concentrice, cu marginea scuamoasă, uscată. Este răspîndit în Indonezia, Vietnam, China de sud, Oceania și mai puțin în cele două Americi.

— *Trichophyton magnini* (sinonim: *Trichophyton rosaceum* sau *roseum*). Este întîlnit mai mult în cîteva țări din Europa. Se izolează din tricofiții ușor inflamatorii ale bărbii. Poziția lui în categoria dermatofiților antropofili este discutabilă, deoarece i se bănuiește o origine animală, încă nedemonstrată.

— *Trichophyton soudanense* și *Trichophyton vaoundi*, specii endemice numai în Africa, nu au încă o poziție bine precizată în nomenclatura dermatofiţilor, acestea putînd să constituie variante ale unor tipuri cunoscute.

Încheiem grupul dermatofiţilor antropofili cu menţionarea a încă două specii, recent descoperite. Acestea sînt :

— *Microsporum nanum* — izolat pînă în prezent numai de 6 ori şi denumit astfel din cauza aspectului microscopic al numeroaselor fusuri mici, prezente în cultură, în formă de bec sau pară, cu unul sau două septuri.

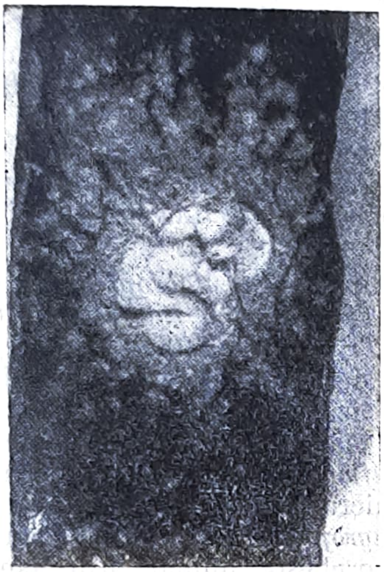


Fig. 459. — Microsporon ferrugineum — cultură în tub.

— *Microsporum distortum* — Di Menna şi Marple, 1954 — este caracterizat prin fusurile îndoite, în formă de corn. A fost izolat pînă acum numai în Noua Zeelandă şi în America de Nord.

Asupra acestor două ultime specii credem că încadrarea lor în grupul dermatofiţilor antropofili (Agelo) este încă nejustificată, deoarece unele din ele (*Microsporum distortum*) au fost găsite şi la animale (maimuţă, cîine), astfel că nu s-ar putea preciza gazda primară. De asemenea, *Microsporum nanum*, izolat mai ales de la om, dar şi de la animale (porci), ar putea să fie încadrat mai degrabă în grupa dermatofiţilor geofili. Noi l-am găsit — în ţara noastră — ca saprofit al solului.

II. *Grupa dermatofiţilor zoofili* cuprinde mai puţine specii, pe care le vom descrie în ordinea importanţei şi frecvenţei lor. Acestea sînt :

— *Microsporum canis* — Bodin, 1897 (sinonime : *Microsporum lanosum*, *Microsporum felineum*) este o specie care recunoaşte drept gazdă principală cîinele şi pisica. La noi în ţară parazitează mult mai frecvent pisica. Mult mai rar sînt parazitate alte animale, de unde se poate transmite şi la om, provocînd microsporii superficiale ale pielii capului la copil şi extrem de rar la adult. Rareori poate să provoace microsporii de tip inflamator, supurat ; foarte rar microsporii ale bărbii. În schimb, acest dermatofit se izolează destul de des de pe pielea glabră, unde poate să determine leziuni în orice parte a corpului care a venit în atingere directă sau indirectă cu animalul bolnav. Poate

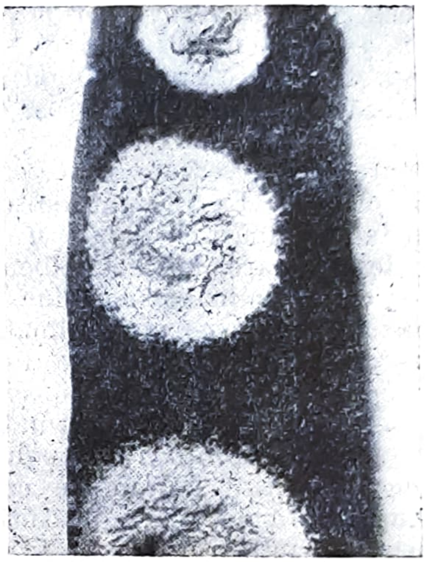


Fig. 460 A. — Trichophyton gypseum

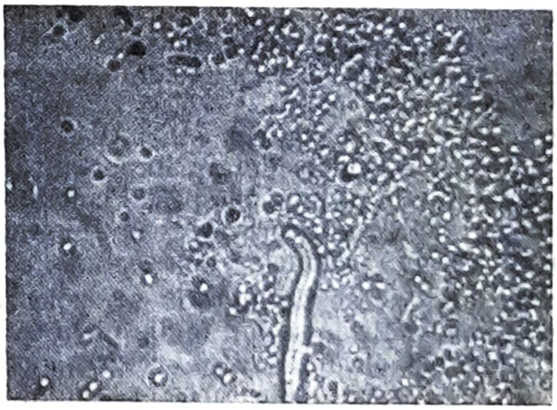


Fig. 460 B. — Aleurii în grămezi şi fusuri alungite şi rotunjite la capăt, tip *Trichophyton gypseum*.

să provoace leziuni numeroase și diseminate, de tip herpes circinat, ajungînd pînă la 100 de leziuni pe același individ. Dintre adulți, femeile dau numărul cel mai mare de contaminări de la animale (pisici). *Microsporum canis* provoacă uneori epidemii familiale, în familiile care găzduiesc animalul parazitat.

Cultura acestui dermatofit se dezvoltă mai repede decît cea de *Microsporum audouini*. Ea apare la 4—5 zile de la inoculare, sub forma unei colonii care crește rapid în mod centrifug, acoperită de un puf mai lung, gros, de aspect lînos (de unde și denumirea de „lanosum"), avînd culoare galben-verzuie, ușor detașabil de mediul de cultură. La început cultura poate să aibă unele asemănări cu cea de *Microsporum audouini*, deși culoarea inițială galbenă-verzuie a coloniei și creșterea mai rapidă sînt un indiciu pentru prezența microsporului animal. Examenul microscopic al unei porțiuni din cultură hotărește repede diagnosticul de specie. Morfologia microscopică a acestui dermatofit este caracterizată prin prezența a foarte numeroase *fusuri*, lungi, ascuțite la ambele capete, cu suprafața mărginită de mici ridicături și interiorul împărțit prin septuri în 7—14 cămăruțe (loji). Filamentele miceliene sînt septate și, de multe ori, au aspectul de miceliu în rachetă.

— *Trichophyton mentagrophytes* — Robin, 1853 — este o specie foarte răspîndită în toată lumea. I se recunosc două variante : granulară și pufoasă.

a) *Trichophyton mentagrophytes*, varianta *granulară* (sinonime : *Tr. gypseum*, *Tr. asteroides*, *Tr. granulosum* etc.) este adevărata specie de origine zoofilă. Ea are ca gazdă șoarecele de cîmp, calul, oaia, capra, precum și unele animale ca ariciul, cangurul etc. Alte animale gazdă, pe care le considerăm importante, sînt animalele de laborator și în special cobaii, care, de obicei, sînt purtătorii acestui dermatofit, chiar în absența semnelor clinice.

De la om, acest dermatofit se izolează în special din tricofițiile supurate ale pielii capului sau bărbii (așa-numitul *Kerion Celsi*), mai rar din formele uscate ale acestor manifestări clinice. Mai poate fi izolat și din diverse tipuri de leziuni mai mult sau mai puțin inflamatoare ale pielii.

Cultura este ușor de recunoscut, datorită aspectului gipsos al suprafeței ei, care devine vizibil la 6—8 zile de la însămînțare. Colonia are la început o culoare albă, cu centrul uneori puțin ridicat și periferia mărginită de radiații fine pufoase, care se pierd pe nesimțite la suprafața mediului. Cîteodată apare un aspect de steluțe gipsate. Suprafața culturii se detașează ușor cu ansa de mediul de cultură.

Imaginea microscopică este destul de bogată, variată chiar, cu *abundente aleurii*, de formă rotundă, dispuse în masă compactă, izolate sau în ciorchine, cu fusuri avînd extremitatea rotunjită, legate de miceliu printr-un pedicul scurt și gros, sau izolate în masa aleuriilor, în număr însă mult mai redus decît la *Microsporum canis*. În sfîrșit, se mai pot întîlni numeroase *spire* sau terminații filamentoase în „coarne de cerb". Acest aspect macro- și microscopic face ca aceasta să fie una din speciile cele mai ușor de identificat.

b) *Trichophyton mentagrophytes*, varianta *pufoasă* sau *Trichophyton interdigitale* (sinonime : *Tr. pedis*, *Tr. Kaufman-Wolf* etc.) trebuie trecut la grupa dermatofiților antropofili, deoarece nu parazitează decît pielea glabră. De aceea socotim ca mai corectă denumirea de *Epidermophyton Kaufman-Wolf*. Datorită asemănării macro- și microscopice cu dermatofitul zoofil (*Tr. mentagrophytes*, varianta granulară), de care se deosebește numai prin aspectul mai pufos al culturii, la început majoritatea micologilor consideră această specie ca o varietate de *Tr. mentagrophytes*, care s-a adaptat în decursul timpului numai la parazitarea umană.

Epidermophyton Kaufman-Wolf este una din speciile cel mai frecvent izolate din epidermofițiile picioarelor, ale spațiilor interdigitale și ale tălpilor, mai ales în formele cu vezicule și bule. De asemenea provoacă relativ frecvent onicomicoze la degetele de la picioare, precum și leziuni ale mîinilor (degete și palme). Mai rar determină leziuni în regiunea inghinală sau pe alte porțiuni ale corpului (gambe, fese etc.).

— *Trichophyton verrucosum* — Bodin, 1902 (sinonime : *Tr. album*, *Tr. ochraceum*, *Tr. discoides*) este specia care provoacă tricofiția vițeilor și care se transmite omului, dînd leziuni inflamatoare, supurate, ale pielii, uneori erupții întinse, ca o hartă geografică, precum și — de multe ori — leziuni ale regiunilor păroase, mai ales în barbă, mult mai rar în pielea capului. Colonia are asemănări macroscopice cu cea de *Trichophyton schoenleini*. Crește foarte încet, necesitînd uneori și 3—4 săptămîni pentru ca să atingă o dezvoltare ce-i permite identificarea. Este mică (1 cm diametru), ușor proeminentă, de consistență pîsloasă, uneori de culoare gălbuie-cenușie, ceroasă, alteori acoperită cu un puf foarte scurt, abia vizibil, de culoare albă. Morfologia microscopică este destul de săracă, singurele elemente mai deosebite putînd să fie o serie de celule mari rotunjite, sau poliedrice (asemănătoare unor clamidospori), așezate în lanțuri.

— *Trichophyton quinckeanum* — Zopf, 1890 (sinonime : *Achorion quinckeanum*, *Achorion murris*, *Sabouraudites quinckeanus*, *Trichophyton niveum*) este agentul favusului murin. Mai rar se poate întîlni și la pisică, care probabil se contaminează și ea de la șoarece. Destul de frecvent apare în crescătoriile de șoareci albi, unde poate să provoace epidemii foarte întinse, cu posibilitatea de transmitere la om, căruia poate să-i determine variate manifestări clinice, mai ales pe pielea glabră. Aici el produce herpes circinat și chiar favus cu godeuri. Mult mai rar îl găsim în leziunile din regiunile păroase, unde dă tricofiții de aspect tondant, favus cu godeuri sau *Kerion Celsi* (pe pielea capului), sau sicozis mai mult sau mai puțin inflamator (în barbă).

Aspectul macroscopic al coloniei de *Trichophyton quinckeanum* este pufos, alb-catifelat, cu centrul ușor deprimat, iar alteori ridicat în formă de cupolă și cu margini radiate, care se pierd ușor în masa mediului de cultură.

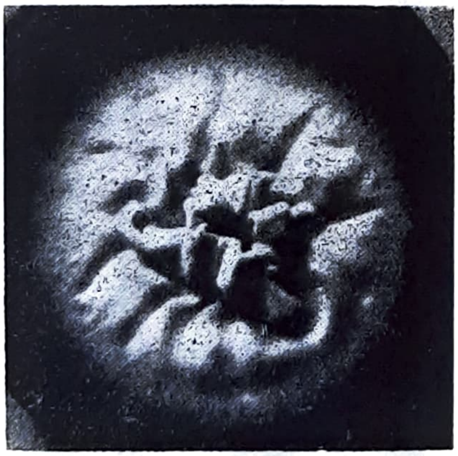


Fig. 461. — *Trichophyton (Achorion) quinckeanum.*

Din punct de vedere microscopic găsim *aleurii* relativ numeroase, mai ales *piriforme*. Prezența fusurilor neregulate, cu perete subțire, nu este un fapt constant, ele putînd să lipsească la anumite tulpini. Criteriul sigur de diferențiere a acestei specii o dă numai inocularea la animale de laborator (în special șoareci albi), la care provoacă apariția de formațiuni caracteristice — godeuri — tipice pentru favus.

Deși unii autori consideră această specie ca o variantă a *Tr. mentagrophytes*, totuși, aspectul macro- și microscopic al culturii și mai ales inocularea pozitivă la șoricei albi cu provocarea godeurilor caracteristice, ne face să acordăm deocamdată acestui dermatofit o autonomie aparte.

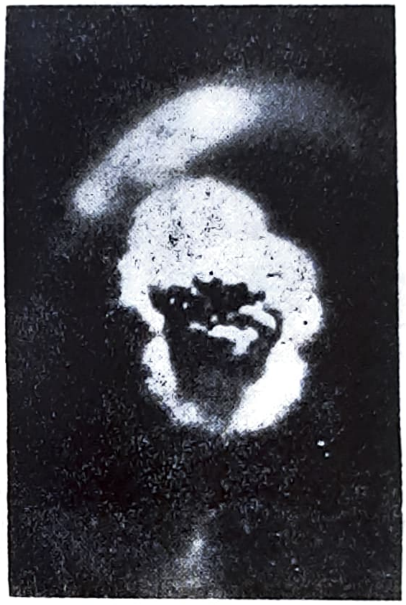
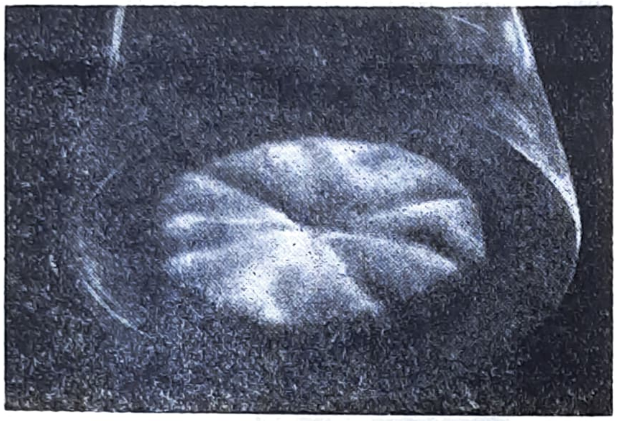


Fig. 462. — *Trichophyton verruccosum (album).*

Mai rar semnalată în dinamica florei dermatofitice mondiale, ca putînd să provoace leziuni la om, această specie a fost întîlnită și în țara noastră.

O specie zoofilă care prezintă multe asemănări macro- și microscopice cu *Tr. quinckeanum*, însă care e mult mai rar întîlnită la om este *Trichophyton gallinae* — Megnin, 1881 (sinonime : *Achorion gallinae*, *Sabouraudites gallinae*). Acest dermatofit provoacă leziuni micotice păsărilor de curte, rareori transmisibile și la om, căruia poate să-i provoace variate manifestări clinice. Aceste leziuni sînt asemănătoare celor date de *Tr. quinckeanum*. Coloniile se deosebesc de cele de *Tr. quinckeanum* prin apariția unui pigment roz-smeuriu, care difuzează în masa mediului de cultură.

— Ultima specie din grupul dermatofiților zoofili este *Trichophyton equinum* — Matruchot și Dassouville, 1898, parazit al calului, care poate să fie transmis foarte rar și la om. Cultura se dezvoltă încet, în 2—3 săptămîni, sub forma unui disc pufos, alb, uşor cutat. Îmbătrînind, capătă un revers galben-roşcat. Microscopic, numai aleurii, destul de numeroase şi uneori micelii în rachetă.



Fip. 463. — *Trichophyton rubrum* — cultură în flacon Erlenmeyer.

III. *Grupul dermatofiţilor geofili* este format din specii de ciuperci care au fost găsite ca saprofiţi ai solului şi care prezintă caractere morfologice şi histologice asemănătoare cu dermatofiţii. Dintre aceşti dermatofiţi geofili, doar foarte puţini pot să treacă la viaţa parazitară şi să devină patogeni pentru om sau animal.

Izolarea dermatofiţilor geofili din sol se bazează pe proprietatea pe care o au ciupercile keratinofile de a ataca produsele cheratinizate (peri, pene, unghii, scuame etc.). Se foloseşte metoda To-Ka-Va (Toma-Karling-Vanbreuseghem), care constă în punerea unor probe de pămînt în contact cu aceste produse şi urmărirea parazitării acestora în timp. Se folosesc cutii Petri sterile, în care se aşază probele de pămînt care urmează să fie cercetate şi la suprafaţa cărora se depun fire de păr uman sau animal (preferabil păr de cal), sterilizate în prealabil prin fierbere. Pămîntul folosit se umezeşte puţin cu cîteva picături de apă distilată, reînnoite la anumite intervale, pentru ca să nu se usuce prea tare. Se recomandă ca perii utilizaţi să fie aşezaţi de preferinţă individual şi nu în smocuri, pentru ca să nu fie invadaţi prea repede de mucegaiurile banale, care împiedică apoi pătrunderea eventualilor dermatofiţi care s-ar afla în pămîntul de cercetat.

Cutiile se închid şi se păstrează o parte la temperatura camerei, altele la termostat.

Urmărirea apariţiei şi dezvoltării ciupercilor din sol se face la intervale de aproximativ o săptămînă, însă pe o perioadă îndelungată, de 3 pînă la 5—6 luni. Porţiunile minuscule de puf sau mucegai, apărute la suprafaţa perilor depuşi, se ridică cu vîrful unui ac de seringă steril (flambat) şi se cercetează la microscop. În caz de apariţie a unor fusuri sau aleurii, se procedează imediat la însămînţarea lor pe cît mai multe tuburi cu mediu Sabouraud, cu adaos de antibiotic sau actidionă.

— Unul din cei mai răspîndiţi dermatofiţi geofili, saprofit ubicuitar al solului în întreaga lume şi cunoscut de mai mult timp, este *Microsporum gypseum* — Bodin, 1907 (sinonime: *Microsporum fulvum*, *Achorion gypseum*). Este singura specie geofilă care poate să provoace ceva mai frecvent leziuni micotice la om sau animal. La om se izolează mai ales din manifestări cutanate de tip herpes circinat, mai rar din forme clinice variate ale regiunilor păroase (superficiale, subinflamatoare sau chiar supurate — kerion). S-au citat chiar şi cazuri de onicomicoze determinate de acest dermatofit.

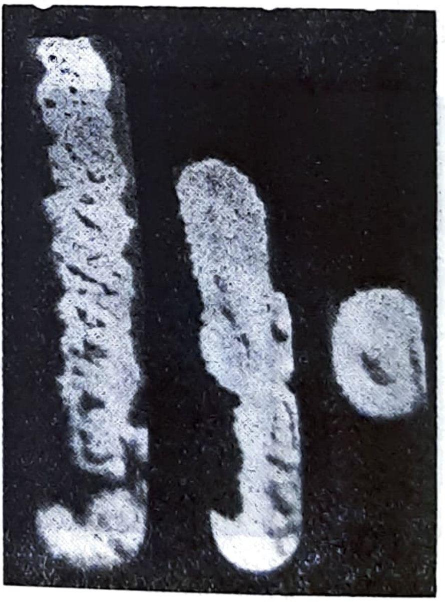


Fig. 464. — *Microsporon gypseum* — cultură în tub.

Cultura se caracterizează printr-o dezvoltare rapidă. Ea are un aspect uşor gipsat, de culoarea cafelei cu lapte, cu marginea pufoasă, albicioasă. Morfologia microscopică este destul de bogată: filamente miceliene în formă de rachetă, aleurii și mai ales extrem de *numeroase fusuri*, ușor rotunjite la capăt, care apar foarte precoce în cultură, uneori chiar mai multe pe aceeași ramură miceliană, septate în 5—8 loji. Uneori se pot observa și vrile în număr variabil. Deși aspectul microscopic al culturii de *Microsporum gypseum* este oarecum asemănător cu cel al *M. canis*, prin abundența de fusuri, totuși culoarea caracteristică de cafea cu lapte a coloniei primei specii permite destul de ușor identificarea ei.

— Pe locul al doilea ca frecvență urmează specia *Keratinomyces ajelloi*, descoperit de Vanbreuseghem în 1952 și denumit astfel în cinstea cunoscutului micolog Ajello. Este de asemenea un saprofit destul de comun al solului, dar a cărui trecere la viața parazitară pe om sau animal este încă discutabilă.

Macroscopic, cultura de *Keratinomyces ajelloi* este destul de ușor de recunoscut, prin aspectul ei fin gipsos de culoare ocru și mai ales prin pigmentul roșu-acaju, care difuzează în mediul de cultură. Morfologia microscopică este de asemenea caracteristică, datorită numărului mare de fusuri de formă alungită, avînd extremitatea rotunjită, cu dublu contur, împărțite în 7—12 loji. Aceste fusuri au aspectul de trabuc sau de franzelă. Unele tulpini prezintă un miceliu în rachetă, vrile strînse și clamidospori în lanțuri (în culturile vechi).

— O variantă foarte asemănătoare cu specia *Keratinomyces ajelloi*, pe care unii autori au semnalat-o ca o nouă specie de dermatofit, patogenă pentru om și animal, este *Microsporum vanbreuseghemi*. A fost identificat în 1962 și denumit astfel după cunoscutul micolog belgian Vanbreuseghem, unul din pionierii teoriei originii saprofitice telurice a dermatofiților. Această specie se deosebește de *Keratinomyces ajelloi* prin faptul că, reversul coloniei nu are pigmentul roșu închis, iar fusurile, de aceeași formă, au un perete gros, echinulat (cu mici țepi). În plus, *Microsporum vanbreuseghemi* mai posedă și numeroase aleurii piriforme, absente la *Keratinomyces ajelloi*.

Poziția acestei specii încă nu este bine stabilită, dat fiind faptul că nu se cunoaște gazda ei precisă (om, animal — cîine, veveriță).

— *Trichophyton terrestre* — Durie și Frey, 1957 — este un dermatofit geofil descoperit în ultimii ani în sol, ceva mai puțin răspîndit ca saprofit decît cei doi dermatofiți menționați anterior. Se găsește relativ frecvent și în solul țării noastre. Cultura lui se aseamănă cu cea de *Trichophyton mentagrophytes*, cu deosebire că aspectul granulos e mai pronunțat și culoarea ceva mai gălbuie.

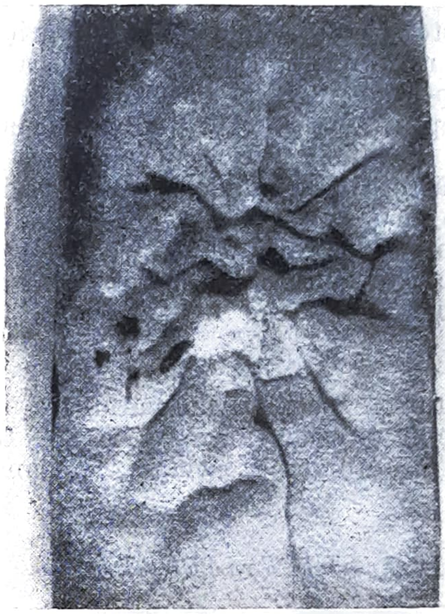


Fig. 465. — **A — *Epidermophyton floccosum* (inguinale) — cultură în tub.**

Aspectul microscopic al culturii arată prezența de filamente miceliene subțiri, uneori miceliu în rachetă și aleurii variabile ca formă, sferice sau piriforme, dispuse în acladium simplu sau compus. Caracteristic este aspectul *macroconidiilor* (fusurilor), care sînt în număr foarte mare, apar devreme în cultură, au o formă

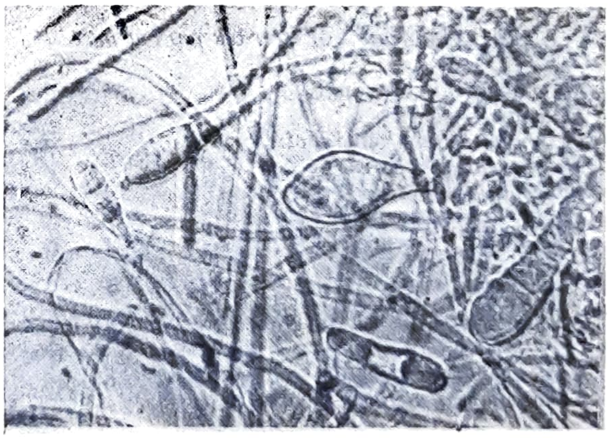


Fig. 465. — *B* — Fusuri măciucate (în banană)— tip *Epidermophyton*.

cilindrică, sînt mici şi prezintă o septare tardivă. Uneori apar şi numeroase vrile strînse.

— *Microsporum cookei*, descoperit în sol în anul 1959 de Ajello şi denumit aşa după distinsul micolog Cooke, a fost luat la început drept o variantă a lui *Microsporum gypseum*. Se deosebeşte însă de acesta, prin apariţia unui pigment roşu-purpuric pe faţa dorsală a coloniei şi prin peretele gros al fusurilor, care au mai multe septuri. Acestea delimitează celule bine distincte unele de altele şi au marginile laterale mai depărtate de peretele fusului. Deşi a fost izolat de la o serie întreagă de animale (rozătoare), totuşi nu s-a dovedit încă patogenitatea sa, animalele nefiind în general purtătoare de leziuni vizibile.

★

Majoritatea speciilor dermatofitice descrise se găsesc în prezent în ţara noastră. Le vom enumera în ordinea frecvenţei, în funcţie de genuri :

I. *Genul Trichophyton*

— *Tr. violaceum* — antropofil
— *Tr. mentagrophytes* { var. *interdigitale* — antropofil
    var. *granulare* (*gypseum*) — zoofil
— *Tr. schoenleini* — antropofil
— *Tr. tonsurans* — antropofil
— *Tr. rubrum* — antropofil
— *Tr. verrucosum* — zoofil
— *Tr. quinckeanum* — zoofil
— *Tr. gallinae* — zoofil
— *Tr. terrestre* — geofil.

II. *Genul Microsporum*

— *M. audouini* — antropofil
— *M. canis* — zoofil
— *M. ferrugineum* — antropofil (x$_1$)
— *M. gypseum* — geofil
— *M. cookei* — geofil
— *M. nanum* — uman (?)
    — geofil (?)

III. *Genul Epidermophyton*

— *Epidermophyton floccosum* — antropofil
— *Keratinomyces ajelloi* — geofil (x$_2$).

Clasificarea, după care au fost enumerate speciile dermatofitice, am ales-o îndeosebi din interes didactic. În prezent nu posedăm criterii bine precizate, clinice şi botanice, care să furnizeze o bază sigură pentru o clasificare riguros ştiinţifică. Cercetările viitoare vor veni să completeze această lacună.

În clasificarea expusă, una din categoriile cele mai bine determinate este grupa dermatofiţilor antropofili. Speciile sînt bine adaptate la viaţa parazitară umană. În extrem de rare cazuri, unii din dermatofiţii antropofili (*Microsporum audouini*, *Trichophyton rubrum*) au fost găsiţi şi la animale (iepure, ciine, cobai). Aceste rare excepţii pot să fie interpretate ca transmise de la om la animal.

Facem o menţiune cu privire la *Microsporum nanum*, considerat de aproape toţi micologii ca fiind de origine antropofilă. Această poziţie credem că ar trebui revizuită, deoarece la noi în ţară a fost găsit ca saprofit destul de răspîndit al solului.

Relativ la grupa dermatofiţilor zoofili menţionăm numai faptul că varianta pufoasă a lui *Trichpohyton mentagrophytes* (*Tr. interdigitale* sau *Epidermophyton Kaufman-Wolf*) nu a fost găsită niciodată la animal. Astfel, *Trichophyton mentagrophytes* ar putea să figureze şi ca antropofil şi ca zoofil.

Pentru unele specii de origine animală ca *Trichophyton mentagrophytes* — varietatea *granulare* (*gypseum*) şi *Trichophyton quinckeanum*, ar putea să pară mai probabilă natura lor geofilă, dat fiind şi faptul că unii autori (între care şi la noi în ţară) au semnalat existenţa lor ca saprofiţi în sol. În felul acesta, credem noi, s-ar putea explica mai uşor apariţia micozelor aşa-zise „spontane'' la animalele care vin în contact cu pămîntul (şoareci, cobai etc.).

Grupa dermatofiţilor geofili este în general bine conturată, ea cuprinzînd speciile care, în mod normal, trăiesc o viaţă parazitară (*M. gypseum*). Nu este exclus ca viitorul să ne rezerve şi alte surprize în ceea ce priveşte rolul solului ca rezervor al dermatofiţilor.

IDENTIFICAREA CIUPERCILOR DIN GRUPUL CANDIDA

Coloniile ciupercilor din grupul *Candida* se dezvoltă foarte repede, chiar la 2 — 3 zile de la însămînţarea materialului patologic care le conţine. Ele se recunosc uşor prin aspectul lor neted, umed, lucios (forma „smooth''),

---

(x$_1$) Am inclus *Microsporum ferrugineum* în grupul *Microsporum* în loc de *Trichophyton*, cum afirmă unii autori, deoarece are acelaşi mod de parazitare şi prezintă fluorescenţa caracteristică speciilor de Microspori (cu excepţia *M. gypseum*).

(x$_2$) Dată fiind morfologia asemănătoare cu cea a *Epid. floccosum*, am preferat să nu creăm un gen aparte pentru această specie.

de culoare alb-gălbuie și consistență cremoasă, ușor detașabilă de mediul nutritiv. Mai rar culturile au un aspect membranos, dantelat (forma „rough"), fiind mai aderente de suprafața mediului. Coloniile de *Candida* degajează un miros caracteristic de drojdie de bere.

Din punct de vedere microscopic, imaginea culturilor dezvoltate pe mediul de izolare (mediul Sabouraud cu 2% glucoză) nu arată decît prezența celulelor levurice înmugurite, mai rar a pseudomiceliilor.

Menționăm că aspectul macro și microscopic descris, așa cum este obținut pe mediul de izolare, nu permite decît identificarea grupului *Candida* și nu a speciilor care fac parte din acest grup. Pentru determinarea speciei trebuie să se recurgă la metode speciale, care se referă la precizarea caracterelor ei morfologice și mai ales fiziologice. Singurul caracter *morfologic* microscopic care poate să permită identificarea numai a unei specii din grupul *Candida* este prezența *clamidosporilor* caracteristici pentru *Candida albicans.* Apariția acestor elemente nu se face însă decît folosind medii speciale, și anume mediul P.C. sau P.C.B. În acest scop, după dezvoltarea coloniilor de *Candida* pe mediul cu agar glucozat 2%, se vor face treceri pe mediul P.C. sau P.C.B., prin însămînțarea cu ansa în striuri, la suprafața mediului, sau în 2 — 3 puncte diferite, avînd grijă să terminăm printr-o dîră în profunzimea mediului, loc în care avem posibilitatea să găsim mai frecvent clamidosporii. După 48 de ore (uneori chiar după 24 de ore pentru mediul P.C.B.) de păstrare a tuburilor la temperatura camerei, 20 — 25°, se observă o dîră albă filamentoasă în locurile trecerilor făcute. Se recoltează cu ansa un fragment din porțiunea menționată, mergînd pînă în profunzime în mediul de cultură și se strivește între lamă și lamelă, examinîndu-l la microscop.

Apariția filamentelor miceliene, a pseudomiceliilor și a *clamidosporilor,* confirmă cu certitudine prezența speciei *Candida albicans,* singura din grupul *Candida* care formează *clamidospori.* Aceste elemente sînt adevărați clamidospori, celule mari (6 — 12 microni), rotunde, cu perete dublu și uneori conținut granular, ce apar la extremitatea unui filament micelian. Examenul cu microscopul în contrast de fază permite o evidențiere deosebită a clamidosporilor, aceștia atrăgînd atenția prin aspectul lor strălucitor, care contrastează cu aspectul mai întunecat al celulelor levurice, al filamentelor și fondului preparatului.

Un procedeu rapid pentru identificarea de *Candida albicans* a fost imaginat de Taschdjian și colaboratorii și e bazat pe o rapidă germinare a levurilor, care filamentează în prezența serului uman sau animal. Se face o suspensie din colonia de *Candida* dezvoltată (luînd un vîrf de ansă și dizolvînd-o în ser fiziologic sau apă distilată). Se adaugă cu pipeta, cîteva picături din ea, în 0,5 ml de ser uman, într-o eprubetă care se agită. Se ține apoi la termostat, la 37°, timp de 4 ore. După aceea, se examinează la microscop o picătură din această suspensie. Dacă celulele de *Candida* încep să filamenteze, este vorba de specia *Candida albicans.*

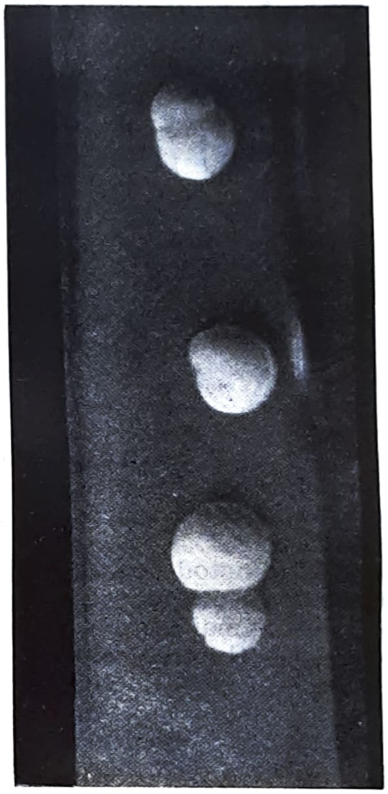


Fig. 466. — Cultură de *Candida* — în tub, pe mediul Sabouraud.

Dacă prezența clamidosporilor nu este pusă în evidență în primele 4—5 zile ale trecerii de *Candida* pe mediul P.C., atunci se procedează la o nouă trecere. Absența clamidosporilor și după a treia trecere, ne arată că nu este vorba de *Candida albicans* și ne obligă să recurgem la cealaltă metodă de identificare, care este legată de prezența caracterelor fiziologice ale speciei. Aceasta este *metoda fermentațiilor*, care se bazează pe una din proprietățile cele mai importante ale ciupercilor levuriforme și anume, aceea de a fermenta zaharurile. Zaharurile întrebuințate în acest scop sînt: glucoza, maltoza, zaharoza, lactoza și rafinoza.

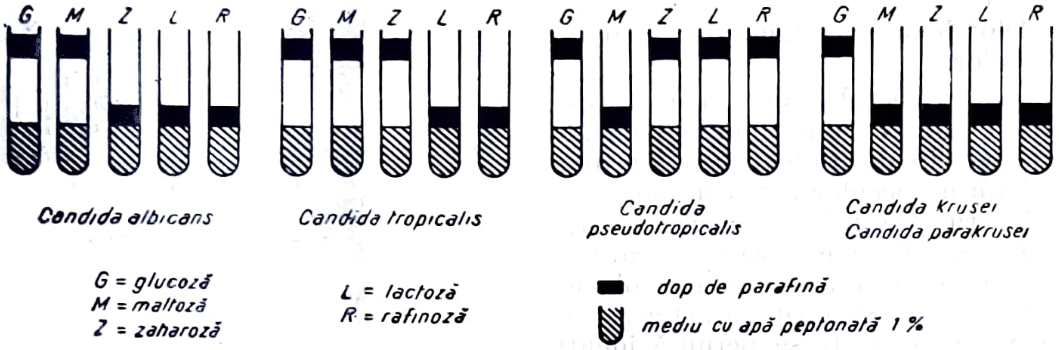


Fig. 467. — Interpretarea probei de fermentație a zaharurilor.

Sînt mai multe metode care se folosesc pentru proba de fermentație a zaharurilor; noi însă ne vom opri numai asupra metodei clasice a lui Langeron și Guerra, care dă rezultatele cele mai fidele. Această metodă constă în a însămînța *Candida* într-o serie de 5 tuburi (12 cm × 12 mm), care conțin un mediu lichid cu apă peptonată 1% și zahărul de studiat și acoperite cu un dop de parafină.

Apa peptonată 1% se prepară prin dizolvarea a 10 g de peptonă în 1 000 ml apă distilată, care se repartizează apoi în 5 baloane, cîte 200 ml în fiecare balon și se sterilizează la autoclav, ca pentru mediile obișnuite.

După sterilizare se introduc aseptic în fiecare balon cîte 4 g din fiecare zahăr (cît mai pur posibil), avînd astfel concentrația de 2% zahăr. Mediul lichid zaharat se repartizează în eprubete mici (sterilizate la pupinel și astupate cu dop de vată) de 12 cm × 12 mm, pe o înălțime de 4—5 cm, cu ajutorul unei pipete sterile.

— *Parafinarea* eprubetelor se face prin depunerea la suprafața mediului cu apă peptonată din micile tuburi a unui dop de parafină lichidă care, prin răcire, se solidifică și închide ermetic conținutul eprubetelor.

— *Tamponul de parafină* se prepară prin amestecul unei părți de ulei de parafină cu două părți de parafină solidă (cu punct de topire la 55°), care se sterilizează la autoclav la 120°. Înainte de întrebuințare se lichefiază acest amestec la baia de apă și apoi se depune, cu ajutorul unei pipete sterile, o cantitate cam de 4 mm grosime, la suprafața mediului lichid din eprubete. Se pun apoi eprubetele la baia de apă ca să fiarbă cîteva minute, în scopul eliminării eventualelor bule de gaz formate, care ar falsifica rezultatul dorit. Eprubetele astfel închise ermetic prin tampoanele de parafină se scot și se lasă să se răcească, după care se pot păstra la frigider, pînă la întrebuințare. În momentul cînd folosim eprubetele pentru proba fermentațiilor, controlăm dacă lichidul din interior este clar. Cele cu un conținut tulbure nu vor fi folosite, deoarece s-au infectat.

— Pentru *însămînțare* se pun cele 5 eprubete cu fiecare zahăr de fermentat, într-un stativ. Se ia fiecare tub și se trece repede, la flacăra becului de gaz, capătul astupat cu dopul de parafină, care prin topirea lui poate fi deplasat și împins cu vîrful ansei de însămînțare spre peretele tubului, de care poate să rămînă lipit. În acest moment, lichidul din tub este însămînțat cu un vîrf de ansă de cultură tînără (de cîteva zile) pură, de *Candida*. (Culturile pure se obțin de obicei prin trecerea speciei de *Candida* pe lichidul Raulin, timp de 3—4 zile. În practică se pot folosi și culturile izolate pe mediul cu antibiotice). După însămînțare se reîncălzesc tuburile la flacără, pentru restabilirea poziției anterioare a dopului de parafină. Se așteaptă pînă ce acesta se solidifică, apoi se pun tuburile la termostat la 25 sau la 37°, citirea rezultatelor făcîndu-se după 3—4 zile. Dopul de parafină împins în sus înseamnă fermentarea zahărului. Se recomandă totuși ca, după o primă citire a rezultatelor, să se păstreze tuburile însămînțate încă trei săptămîni, pentru surprinderea eventualelor fermentații tardive.

Rezultatele fermentației se apreciază după împingerea dopului de parafină, aruncat ca un piston de gazele care se produc prin procesul fermentativ și care se acumulează dedesubt. Prin această ingenioasă tehnică, care permite și reținerea celor mai fine bule gazoase, putem să observăm și fermentații oricît de slabe, care scăpau altădată prin metodele clasice întrebuințate. Dacă, după trecerea intervalului de timp maxim pentru observarea fermentației (3 săptămîni), dopurile de parafină rămîn la locul lor, inseamnă că ciuperca însămînțată nu a fermentat nici un zahăr (levuri *azimatice*).

Examinarea tuburilor poate să ne arate următoarele situații caracteristice :

— Fermentarea glucozei și maltozei, pentru *Candida albicans*.

— Fermentarea glucozei, maltozei și zaharozei, pentru *Candida tropicalis*.

— Fermentarea glucozei, zaharozei, lactozei și rafinozei, pentru *Candida pseudotropicalis*.

— Fermentarea *numai* a glucozei, pentru grupul *Candida krusei* sau *parakrusei*.

Fermentațiile citate se obțin după citirea rezultatelor la 4—5 zile.

Fermentațiile tardive (după 20 de zile) ne pot indica :

— Fermentarea numai a zaharozei, pentru *Candida parapsilosis*.

— Fermentarea tuturor zaharurilor, pentru *Candida guillermondi*.

Metoda fermentațiilor, conform tehnicii lui Langeron și Guerra, este o metodă mai laborioasă, dar cea mai sigură și constantă, pentru determinarea speciilor de *Candida*.

Dacă intensitatea fermentației poate să varieze pentru una sau alta din specii, modificări ale caracterelor fermentative nu s-au observat nici pentru tulpini de *Candida* păstrate în colecție timp de peste 15 ani.

Unii autori întrebuințează pentru proba fermentațiilor o metodă mai simplă, folosită curent în bacteriologie și care dă rezultate tot atît de fidele, ca metoda amintită. Pentru această metodă se folosesc tuburi de 170 × 17 mm, care au în treimea lor inferioară o strangulare, astupată de o bilă de sticlă. Ca mediu lichid de însămînțare se pune tot apă peptonată 1%, la care se adaugă 1% din indicatorul Andrade (soluție 0,5% de fucsină decolorată prin NaOH). Culoarea mediului este galbenă la pH 7,2—7,4 și virează la roșu mai mult sau mai puțin intens după acidificare. Mediul lichid se adaugă în tuburi pînă la nivelul superior al gîtuiturii (cam 9 cm^3), se sterilizează și se adaugă în fiecare tub cîte 1 cm^3 din soluția sterilă 20% a fiecărui zahăr de studiat. Se fierb tuburile 10 minute, pentru evacuarea aerului, și se lasă să se răcească.

Însămînțarea se face prin alunecarea bilei din gîtuitură (care are loc mai ușor decît aceea a dopului de parafină) și emulsionarea în mediu a unei mici porțiuni din cultura tînără de *Candida*. Se păstrează tuburile la 25°. După 48 de ore de incubație se agită tuburile, pentru a evita blocajul gazelor de-a lungul pereților. Citirea rezultatelor fermentației se face după 10 zile și respectiv după 20 de zile, interpretarea lor făcîndu-se ca la metoda Langeron și Guerra.

În afară de metoda fermentațiilor, care este cea mai precisă pentru identificarea speciilor de *Candida*, celelalte metode (care aparțin tot de cercetarea caracterelor fiziologice) printre care *asimilarea zaharurilor* și a *substanțelor azotate* sînt metode adjuvante, care completează proba fermentației. Aceasta este *metoda auxonogramei*, care cuprinde :

a) *Asimilarea zaharurilor* folosește un mediu sintetic, introdus de Lodden și modificat de Langeron, care conține : fosfat monopotasic 1 g, sulfat de magneziu 0,5 g, agar-agar 20 g, apă distilată 1 000 ml. În cutii Petri cu un diametru de circa 15 cm, cu fundul plat, se adaugă cîte 1 ml dintr-o suspensie din colonia de *Candida* pentru identificare (un vîrf de ansă de cultură în 8—10 ml ser fiziologic sau apă bidistilată). Mediul sintetic preparat este lichefiat în baie de apă la 40—50° și apoi turnat în cutiile Petri, într-un strat cam de 1 cm, agitînd bine, dar cu prudență, pentru omogenizarea suspensiei. Apoi este lăsat să se solidifice. Se poate amesteca și înainte mediul lichefiat în baie de apă cu 1 ml din suspensia de levură spălată de 3 ori (2 anse dintr-o cultură de 24 de ore pe centimetrul cub de ser fiziologic). Se agită bine pentru a se realiza un amestec omogen, apoi se toarnă de-a dreptul în cutiile Petri.

După răcirea și solidificarea gelozei se depun pe suprafața mediului, cu ajutorul unei pensete sterile, cîte 6 discuri de hîrtie pentru fiecare cutie Petri. Aceste discuri sînt îmbibate cu 2 picături dintr-o soluție 20% din următoarele zaharuri : glucoză, zaharoză, galactoză, maltoză, lactoză, rafinoză. E de preferat ca fiecare disc să aibă altă culoare. După 24—48 de ore se citește asimilarea, care se traduce printr-o zonă de creştere de 3—4 cm împrejurul zahărului asimilat.

Astfel se poate deosebi *Candida krusei* de *Candida parakrusei*. *Candida krusei* asimilează numai glucoza, în timp ce *Candida parakrusei* fermentează şi alte zaharuri.

Pentru speciile de *Candida* care au aceeaşi auxonogramă a zaharurilor, Pagano şi colaboratorii au imaginat procedeul reducerii clorurii de trifeniltetrazoliu. Acest produs incolor se incorporează în mediul de cultură Sabouraud în cantitate de 0,1 $^{0}/_{00}$, pe care se însămînţează tulpina de *Candida* pentru identificare. *Candida albicans*, ca şi *Candida krusei*, nu reduce TTC, iar mediul rămîne incolor. *Candida tropicalis*, *parakrusei* şi *guillermondi* îl reduc şi coloniile dezvoltate iau o culoare care variază de la roşu viu la roz. Acest mediu cu TTC permite diferenţierea rapidă, în 24 de ore, între cultura de *Candida albicans* şi *Candida tropicalis*, care asimilează aceleaşi zaharuri.

b) *Asimilarea azotului* foloseşte acelaşi mediu sintetic preconizat de Lodder la asimilarea zaharurilor. El conţine în plus glucoză pură 20 g $^{0}/_{00}$, iar geloza este spălată de trei ori, pentru eliminarea oricăror urme de substanţă azotată pe care ar putea să o conţină. Se întrebuinţează aceleaşi discuri de hîrtie, care sînt însă impregnate cu 11 picături din soluţiile următoarelor substanţe chimic pure : peptonă, asparagină, sulfat de amoniu, nitrat de potasiu (soluţie 20%), uree (soluţie 10%). Se recomandă ca, pentru uree să se folosească o cutie Petri proprie, dată fiind marea sa difuzibilitate în mediu.

Citirea asimilării azotului se face după 24—48 de ore. Numai asimilarea nitratului de potasiu are o valoare diferenţială între specii, acesta nefiind utilizat decît de *Candida pelliculosa*. În ceea ce priveşte asimilarea ureei (celelalte substanţe fiind asimilate de toate speciile de *Candida*), rezultatele sînt încă contradictorii între autori, astfel că nu pot să fie luate ca bază certă.

În rezumat, pentru identificarea speciilor de ciuperci din grupul *Candida*, vom recurge la următoarele metode :

1. Însămînţarea produsului patologic pe mediul Sabouraud cu antibiotice şi păstrarea tuburilor la 25—30°. Se poate folosi mediul cu *penicilină* (5000 u./ml) şi *streptomicină* (5000 μg/ml), adăugate la suprafaţa gelozei înainte de însămînţare sau cu *cloramfenicol*, încorporat în geloză înainte de sterilizare, în concentraţie de 0,5 g la 1000 ml.

2. Purificarea tulpinii izolate, prin trecerea ei din nou pe mediul cu agar glucozat 2% şi antibiotice sau mai bine, dacă avem posibilitatea, pe mediul Raulin[1] (1—2 treceri la 48 de ore interval).

3. Trecerea culturii pe mediul P.C. sau P.C.B. pentru a controla apariţia *clamidosporilor*, care permit identificarea speciei *Candida albicans*. În cazul absenţei acestora :

4. Proba fermentaţiei zaharurilor, conform uneia din metodele expuse anterior.

5. Proba auxonogramei.

INTERPRETAREA CULTURILOR DE CIUPERCI PATOGENE IZOLATE DIN MICOZELE PROFUNDE

În cele ce urmează, vom insista îndeosebi asupra caracterelor macro- şi microscopice ale principalilor agenţi micotici, provocatori ai unor micoze profunde care se pot întîlni relativ mai frecvent în practica micologică în ţara noastră. În descrierea acestor specii vom căuta să ţinem seama de clasificarea care cuprinde caracterele mai importante de grup comune acestora. Multe dintre ele sînt întîlnite numai cu totul sporadic în ţara noastră. De aceea le vom menţiona numai pe acelea care au avut sau care pot să aibă o oarecare frecvenţă în manifestările clinice provocate.

a) *Clasa Actinomicetelor* cuprinde ciuperci caracterizate printr-un miceliu filamentos foarte fin, cu diametrul de 1 μ (sau chiar mai puţin), continuu, neseptat, uneori fragmentat în articole baciliforme sau coniforme, cuprinde *specii*

---

[1] *Mediul Raulin* este folosit pentru purificarea tulpinilor de ciuperci izolate, mai ales cele levuriforme, de eventualele bacterii supraadăugate.

Formula lui este următoarea :

Apă distilată	1 500	ml
Zahăr candel	70	g
Acid tartric	4	g
Nitrat de amoniu	4	g
Fosfat de amoniu	0.6	g
Carbonat de potasiu	0,6	g
Carbonat de magneziu	0,4	g
Sulfat de amoniu	0,25	g
Sulfat de zinc	0,07	g
Sulfat de fier	0,07	g
Silicat de potasiu	0,06	g

G. Bertrand este de părere că se poate completa formula de mai sus prin adăugare de sulfat de manganez 0,07 g.

Se dizolvă zahărul de candel în 500 ml apă fiartă ; se sterilizează la autoclav la 115°, timp de 15 minute.

Restul elementelor se dizolvă în 1 000 ml şi se sterilizează şi ele la autoclav, la aceeaşi temperatură şi durată.

Se amestecă aseptic cele două soluţii, în momentul întrebuinţării. Putem prepara şi mediu solid prin adăugare de 2% geloză.

TABELUL 146

Identificarea speciilor din grupul *Candida*

Clamidospori	Fermentarea zaharurilor					Auxonograma											Specia
						Asimilarea zaharurilor						Asimilarea azotului					
	G	M	Z	L	R	G	M	Ga	Z	L	R	Pe	As	Sa	Np	Ur	
Prezenţi	+	+	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	+	*Candida albicans*
Absenţi	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—	*Candida stelatoidea*
Absenţi	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	*Candida tropicalis*
Absenţi	+	—	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	*Candida pseudotropicalis*
Absenţi	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	*Candida krusei*
Absenţi	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—	*Candida parakrusei*
Absenţi	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—	*Candida guillermondi*
Absenţi	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	*Candida pelliculosa*

***Legendă* :**

G = glucoză
M = maltoză
Z = zaharoză
L = lactoză
R = rafinoză
Ga = galactoză
Pe = peptonă
As = asparagină
Sa = sulfat de amoniu
Np = nitrat de potasiu
Ur = uree

anaerobe (tip *Actinomyces israeli*) şi *specii aerobe* (*Nocardia* sau *Streptomyces madurae*).

b) *Clasa Ascomicetelor* cuprinde ciuperci caracterizate printr-o formă de fructificare perfectă — *ascosporul*, un spor format în interiorul unei celule diferenţiate (asc), care reprezintă o formă de rezistenţă eliberată prin distrugerea ascului. Apariţia ascelor corespunde la epuizarea rezervelor nutritive ale mediului. Din acest grup amintim specia : *Allescheria boydii*.

c) *Clasa Fungi imperfecti* (sinonime : *adelomycete*, *deuteromycete*, *hyphomycete*), cuprinde ciupercile adevărate. Ele sînt caracterizate printr-un miceliu filamentos, septat şi ramificat, care nu au decît forma de reproducere imperfectă. Din acest grup vom enumera numai unele specii, în ordinea frecvenţei : *Madurella mycetomi*, *Aspergillus fumigatus*, *Sporotrichum schenkii*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Geotrichum candidum*, *Cryptoccocus neoformans*.

Speciile enumerate formează majoritatea ciupercilor adevărate, iar cea mai mare parte dintre ele se găsesc şi în ţara noastră, determinînd mai mult apariţia de cazuri sporadice. În ceea ce priveşte manifestările clinice determinate de aceste ciuperci, credem că ele trebuie să fie denumite în funcţie de agentul patogen care le provoacă, adică : maduromicoze, sporotricoze, geotricoze, coccidioidoze, aspergiloze, histoplasmoze etc.

Fig. 468. — ***Actinomyces israeli*** **— cultură în tub pe mediul Tarozzi.**

În descrierea culturilor vom ține seama și de materialul patologic în care ele pot să fie puse în evidență și din care se fac însămînțările pentru precizarea speciei.

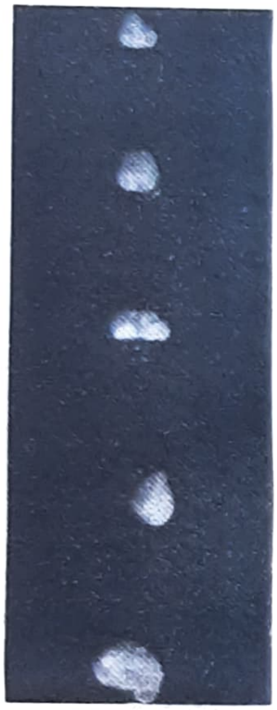


Fig. 469. — Nocardia madurae — cultură în tub pe mediul Sabouraud.

1. Din grupa *actinomicetelor anaerobe*, specia tip este *Actinomyces israeli*, agentul patogen al actinomicozei clasice, cu localizare cervicofacială, pleuropulmonară, abdominală sau cutanată.

Cultura se obține relativ destul de repede — 5—6 zile — prin însămînțarea grunjilor pe mediile Tarozzi și geloză Veillon în condiții de anaerobioză parțială la 37°. Pe mediul Tarozzi apare sub forma unor mici colonii albicioase, fin pufoase, care se dezvoltă progresiv deasupra stratului de albuș de ou coagulat. Coloniile sînt fragile, desfăcîndu-se în mici fragmente, ca niște norișori, la cea mai mică agitare a mediului, fără însă să tulbure mediul.

Pe geloza profundă se observă colonii mici, cît un bob de linte, albicioase, de consistență semisolidă.

Prin treceri succesive pe același mediu se dezvoltă din ce în ce mai repede, uneori chiar după 24—48 de ore, adaptîndu-se cu încetul și la condițiile de aerobioză, pe mediul Sabouraud, agar glicerinat etc. Coloniile devenite aerobe au un aspect cerebriform, aderente de mediul de cultură, asemănătoare cu cele de actinomicete aerobe.

Aspectul *microscopic* al culturii de *Actynomyces israeli* este destul de uniform, indiferent de mediul pe care se dezvoltă. Se remarcă prezența filamentelor fine, foarte subțiri (0,6—1 μ diametru), drepte sau ondulate, neseptate, cu ramificații scurte, Gram-pozitiv. Filamentele miceliene se pot fragmenta în elemente baciliforme difteroide.

2. Din grupul *actinomicetelor aerobe*, ciuperci patogene din genul *Nocardia* și *Streptomyces* (între care nu ar exista diferențe nete, după cum susțin unii autori), care provoacă *micetoamele cutanate*, actinomicotice, reținem ca mai importante speciile :

— *Nocardia madurae* (sinonim : *Streptothrix madurae*) — unul dintre agenții micotici cei mai frecvent întîlniți în etiologia micetomului cutanat actinomicetic — se dezvoltă ușor, dar destul de încet pe mediile uzuale, la 37° în aerobioză. Pe mediul Sabouraud, cel mai des folosit în acest scop, colonia are un aspect cerebriform, este aderentă de mediu, de consistență elastică, de culoare albă-cenușie, mergînd pînă la roșiatic și chiar șocolatiu. Pe agar glicerinat, coloniile se dezvoltă la fel de bine, avînd la început un aspect lucios alb-crem, apoi virînd în roz.

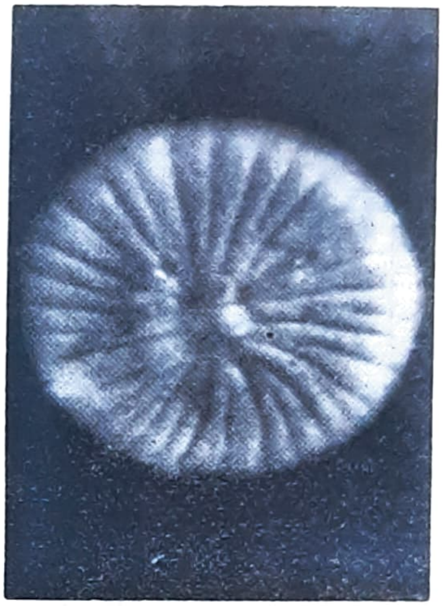


Fig. 470. — Allescheria boydii — cultură în flacon Erlenmeyer. *Inframicrobiologie.*

Din punct de vedere microscopic, cultura este formată din filamente miceliene subțiri, ramificate, de aspectul acelora care se găsesc și în grăunții însămînțați (sub 1 μ diametru), Gram-pozitiv.

Dintre ascomicete, menționăm — ca mai importante pentru țara noastră — specia *Allescheria boydii* (sinonim : *Monosporium apiospermum*). Este specia care se izolează cel mai frecvent din micetoamele fungice cu grunji albi.

Colonia se dezvoltă perfect pe mediul Sabouraud, începînd să apară cam la 3—4 zile de la însămînțare și se prezintă ca un puf lînos, ușor proeminent, alb la început, apoi cenușiu, uscat, cu reflex verzui-măsliniu. Cu timpul, colonia capătă un aspect puțin cutat, fiind împărțită într-o serie de sectoare, cu un miceliu aerian; marginile coloniei sînt fin radiare.

Aspectul microscopic ne arată un miceliu septat, ramificat, cu peretele subțire și niște formațiuni ovalare sau piriforme, închise la culoare, cu pereții groși, dispuse cîte una singură (monospor) la extremitatea unui filament miceliar.

Din clasa fungilor imperfecți reținem *Madurella mycetomi*. Acesta este agentul patogen cel mai frecvent izolat din micetoamele cu grunji negri și care se dezvoltă bine pe orice mediu. Coloniile apar destul de repede, după cîteva zile de la însămînțare, la început rotunde, cu marginile în franjuri, de culoare albă, apoi cenușie pînă la galbenă-brună, cu un pigment brun care difuzează în masa mediului de cultură. Pe mediile cu extract de morcovi și cartofi (mediul P.C.) apar la suprafață niște mici formațiuni negre, tari, asemănătoare grunjilor, care se numesc *sclerote*.

Structura microscopică a coloniei arată prezența unui miceliu septat la intervale neregulate, care formează artrospori de dimensiuni variabile. În culturile mai vechi se observă *clamidospori* mari, de formă mai mult sau mai puțin regulată, uneori dispuși în lanțuri.

Sporotrichum schencki (sinonim *Sporotrichum beurmani*) este agentul patogen al sporotricozei (limfangită gomoasă subcutanată sau profundă). Parazitul nu e de obicei vizibil la examenul direct al materialului patologic (puroi și chiar biopsie). Rareori, cînd e vizibil, se poate prezenta sub forma de levuri sferice sau ovalare, grupate, ori sub forma de „corpi asteroizi".

Corpii asteroizi pot fi: a) în formă de „țigară", cu extremitatea rotunjită, largi de 2—3 μ și lungi de 3—5 μ, așezați intracelular, în leucocite sau în celule gigante; b) de formă „asteroidă" — element regulat rotunjit, constituit dintr-un spor rotund, cu perete dublu, mai colorat. Suprafața acestui corpuscul este acoperită de raze, ca niște măciuci, dînd un aspect de stea.

Aceste forme (cînd se văd) se observă prin examinarea puroiului între lamă și lamelă, colorat prin metoda May-Grünwald-Giemsa. Se întinde puroiul diluat în 15 volume de ser fiziologic și se colorează prin metoda Giemsa timp de 30 de minute.

Cultura, care este singurul procedeu sigur de diagnostic, se obține prin însămînțarea puroiului (recoltat prin puncție cu o seringă sterilă din leziunile subcutanate nedeschise) pe suprafața mediului Sabouraud. O picătură de puroi se pune pe peretele eprubetei, în unghiul format de geloză și sticlă. Se ține apoi la 37° și la temperatura camerei.

Apariția coloniilor este marcată după 3—5 zile prin niște plăci rotunde, albe-cremoase, netede, opace, asemănătoare cu coloniile de *Candida*. Pe măsura dezvoltării, suprafața culturii devine încrețită, membranoasă, cu o ușoară aureolă pufoasă, ajungînd că ocupe cu timpul toată suprafața mediului de cultură. Pigmentația coloniilor poate să varieze de la tulpină la tulpină, de la alb (pe care unele o păstrează indefinit), trecînd progresiv prin galben-ciocolatiu, la brun și chiar negru. Pigmentul se poate schimba la trecere.

Aspectul microscopic ne arată o rețea de filamente miceliene nu prea largi (2 μ diametru), septate și ramificate, avînd pe ramurile laterale sau la capătul unei terminații miceliene subțiri niște grupuri de spori caracteristici, ovali sau sferici, apoi rotunzi, de culoare brună și cu perete dublu în culturile vechi. Separați de suportul lor, acești spori, a căror dimensiune variază între 3—5/2—4 μ se pot înmulți prin înmugurire.

Aspergillus este denumirea dată unui grup de ciuperci cunoscute de obicei ca cei mai banali contaminanți ai laboratorului. Ele pot să devină patogene, provocînd unele manifestări cutanate auriculare, sinuzale, oculare sau pulmonare, înglobate în capitolul *aspergilozelor*. Dintre speciile acestui grup, *Aspergillus fumigatus* este întîlnit mai des ca agent patogen al acestor manifestări.

Trebuie arătat de la început că, deși coloniile de *Aspergillus* pot să se dezvolte din însămînțările materialului patologic suspectat, aceasta nu constituie o dovadă concludentă că el este cauza primară a leziunilor cercetate, deoarece se poate găsi acolo ca o suprainfecție.

În materialul de examinat (spută, exsudat din ureche, puroi etc.), această ciupercă poate să se prezinte sub forma de filamente miceliene fragmentate, cu numeroși spori mici (2—3 μ), rotunzi, de culoare verde-închisă, negricioasă, răspîndiți de-a lungul preparatului.

Culturile se dezvoltă foarte repede la temperatura camerei, întîi sub forma unui disc alb, linos, la suprafața mediului, care în scurt timp devine verde spre negru-verzui.

Din punct de vedere microscopic, caracteristică pentru toate speciile de *Aspergillus* este prezența „capetelor aspergilare", niște formațiuni globulare de la capătul filamentului micelian, a căror suprafață este acoperită de niște prelungiri radiare, ce poartă lanțuri lungi de spori. Capetele aspergilare se pot observa mai bine direct pe tubul de cultură, examinat prin culcarea lui pe masa microscopului.

— *Coccidioides immitis* este agentul patogen al bolii numite *coccidioidomicoză* sau *granulomul coccidioidian*. Acesta poate să se localizeze atît pe piele, unde determină apariția de abcese sau gome cu tendință la ulcerații, cît și în organele interne (plămîni, oase, sistem nervos central), unde dă leziuni nodulare generalizate.

Cultura se obține ușor pe mediul Sabouraud, în 4—5 zile, la 25°. Coloniile sînt rotunde, cenușii, cu un miceliu aerian pufos, alb, lînos, care cu timpul se închide la culoare. Unele tulpini au aspect membranos.

Examenul microscopic al materialului recoltat (puroi din abcese subcutanate, exsudate din leziuni ulcerate, spută, conținut gastric, lichid cefalorahidian) ne poate arăta prezența de corpi rotunzi (liberi sau intracelulari, în celule gigante), de diametru variabil (20—60 μ), cu pereți groși, refringenți, cu conținut omogen, apoi granulos. Ei sînt umpluți de numeroși endospori mici (2—5 μ), uninucleați. Uneori acești corpi rotunzi au aspect *echinulat* (țepos).

Se constată de asemenea prezența de filamente miceliene septate în artrospori dreptunghiulari, așezați în formă de lanțuri, care, examinați în cloral-lacto-fenol, se prezintă sub forma de articole întunecate, separate de spații filamentoase, clare. Uneori se găsesc și clamidospori.

Chisturile sferice întîlnite la examenul direct nu se observă decît foarte rar în culturile vechi.

Menționăm că *transferarea culturilor de pe un mediu pe altul, trebuie făcută cu mare atenție, deoarece există posibilități serioase de contaminare prin artrospori*. Este preferabil să nu se lucreze cu culturi uscate. Procentul de contagiozitate al artrosporilor liberi este mai mare în acest caz.

— *Histoplasma capsulatum* este specia care provoacă histoplasmoza, un sindrom hepatosplenoganglionar sau pulmonar, uneori și cu asociere de leziuni cutaneomucoase ulcerative.

Este vorba de un parazit al sistemului reticuloendotelial. Poate să fie cercetat în frotiuri din sîngele periferic, în măduva sternală, din puncția hepatică sau splenică, biopsii din ganglioni, în frotiuri din spută. Punerea lui în evidență la examenul direct al produselor amintite nu prezintă criterii precise de diagnostic. De aceea, singura probă micologică care poate să ne fie utilă este cultura.

Produsele patologice colectate în cutii Petri sterile se însămînțează imediat pe mediul Sabouraud cu antibiotice în cît mai multe tuburi, unele păstrate la temperatura camerei, altele la 37°. Pentru conținutul gastric este de preferat să se facă însămînțarea sedimentului obținut prin centrifugare. Tuburile trebuie păstrate cel puțin 3 săptămîni de la însămînțare, deoarece cultura se dezvoltă foarte lent. Abia după 3—4 săptămîni încep să apară colonii rotunde, ușor pufoase, albe, cu un miceliu aerian, care devine cu timpul de culoare brună.

Aspectul microscopic este ceva mai caracteristic. El constă din filamente miceliene ramificate, unele în rachetă, spori mici, rotunzi sau ovali pe ramurile laterale, clamidospori mari (10—20 μ), tuberculați, rotunzi sau piriformi, cu peretele gros.

— *Geotrichum candidum* este specia care dă *geotricozele*, boli cu localizare mai ales în gură, tractul intestinal și aparatul respirator (bronhii, plămîni) și mult mai rar în alte regiuni.

Deoarece această ciupercă este un saprofit banal al cavității bucale și tractului intestinal, descoperirea ei în spută, pe piele sau în fecale, nu poate să fie luată în considerație decît atunci cînd se află în cantitate foarte mare și la examinări repetate.

În preparatele proaspete ale materialului recoltat (spută în special), trebuie diferențiată de elementele de *Candida*. Se prezintă sub forma unei celule rotunde sau dreptunghiulare (4—8 μ), uneori cu terminația puțin rotunjită.

Culturile cresc repede pe mediul Sabouraud, la temperatura camerei sau la 37°, chiar la suprafața mediului, sub forma unor colonii albe-cenușii, netede, apoi opace, cu centrul ceva mai proeminent, iar restul porțiunii, pătrunzînd mai adînc în mediu, este de aspect fin încrețit sau vermiculat.

Microscopia culturii arată un miceliu hialin, septat în artrospori dreptunghiulari, de lungime variabilă, unii izolați, alții uniți în lanțuri scurte. Se văd de asemenea celule sferice, formate tot din miceliu.

— *Cryptococcus neoformans* (sinonim *Torulopsis neoformans*, *Torula histolitica*) este agentul etiologic al *criptococozei*, o boală gravă, cu evoluție subacută sau cronică, cu localizări de predilecție viscerale (cerebrale, meningiene, peritoneale, pulmonare) și mai rar localizări cutanate.

Examinarea materialului recoltat (sedimentul lichidului cefalorahidian, spută, puroi din leziunile subcutanate) ne arată prezența de elemente celulare rotunde sau ovoide, cu perete gros, cu dublu contur, înconjurate de o capsulă gelatinoasă, care se observă mai bine în preparatele colorate cu cerneală de India.

Cultura se dezvoltă ușor pe mediul Sabouraud, la 37° și la temperatura camerei. La temperatura camerei, culturile cresc încet, avînd aspectul unor colonii de drojdie de bere, de culoare albă-crem, încrețite și granulare. Culturile dezvoltate la 37° sînt viscoase, strălucitoare, cu conturul ușor bombat, de culoare crem spre maro, asemănătoare cîteodată cu cele ale bacilului Friedländer.

Structura microscopică a coloniilor este destul de simplă, arătînd doar prezența de celule înmugurite și unele cu un tub terminal scurt, germinativ. Capsulele se pot distinge numai în preparatele colorate cu cerneală de India.

Această specie se deosebește de ciupercile din grupul *Candida* (cu ale căror colonii prezintă unele asemănări) prin absența oricăror proprietăți fermentative.

Încheiem prezentarea ciupercilor care provoacă micozele profunde cu un grup care dă o micoză foarte rară, *cromomicoza.* În întreaga lume s-au înregistrat circa 200 de cazuri pînă în prezent. Se mai numește și dermatita verucoasă cromomicozică. Boala este caracterizată prin tumori cutanate verucoase sau papilomatoase, infiltrate, cu localizare mai frecventă la membrele inferioare.

Deoarece acest sindrom poate să fie provocat de trei paraziți : *Phialophora verrucosa*, *Phialophora pedrosoi* și *Cladosporium species*, pentru determinarea speciei în cauză este absolut necesară obținerea de culturi din materialul patologic.

Examenul direct al prelevării (biopsie mai ales, uneori și scuame) pune în evidență, oricare ar fi specia, numai prezența celulelor „fumagoide'', elemente rotunjite de 8—15 μ, de culoare verzuie-brună, izolată sau în grup și care se reproduce prin diviziune, nu prin înmugurire.

Culturile au același aspect pe mediile obișnuite : colonii închise, de culoare verde-brună, verde-negricioasă sau neagră-violetă. Reversul coloniei este tot negru, dar pigmentul nu difuzează în mediu. Suprafața coloniei, al cărui centru e puțin mai ridicat, poate să fie mamelonată sau brăzdată de șanțuri radiare. Marginea e bine delimitată, uneori are franjuri. Cultura crește destul de încet la 30°. Numai aspectul microscopic al culturii, care prezintă trei tipuri de fructificare, poate să precizeze specia în cauză. Nu insistăm asupra acestei probleme, fiind de domeniul micologiei pure.

Speciile descrise nu epuizează toată gama ciupercilor care provoacă micoze profunde. Am menționat numai pe acelea care se întîlnesc în țara noastră, unele cu o oarecare frecvență (actinomicoze, sporotricoze, micetomul cutanat etc.), altele sub forma de cazuri izolate (cromomicoze, coccidioidomicoze etc.). Nu ne-am oprit de loc asupra acelora ale căror manifestări clinice sînt cu adevărat rarități sau se găsesc numai într-o anumită regiune a globului (de exemplu blastomicoza nord- și sud-americană).

MIJLOACE AJUTĂTOARE ÎN DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL MICOZELOR

Metodele expuse pînă acum — recoltarea materialului patologic, examenul direct, însămînțarea și identificarea culturii — sînt mijloace absolut necesare și suficiente pentru precizarea diagnosticului complet al unei micoze și al agentului provocator.

În cele ce urmează, vom arăta și alte metode ce se pot folosi ca mijloace complementare de diagnostic micologic, mijloace care aduc uneori clarificări asupra reacțiilor imunologice ale organismului invadat de ciupercă, asupra caracterului patogen al acesteia etc. De la început trebuie să menționăm că aceste metode complementare nu exclud posibilitatea aplicării tuturor celorlalte tehnici obligatorii de determinare precisă a naturii micotice a bolii. În plus, mai amintim faptul că metodele pe care le vom descrie mai jos nu sînt aplicabile la toate categoriile de paraziți micotici, în general, ci numai pentru anumite categorii dintre ele.

1. **Fluoroscopia** este o metodă care se folosește numai în diagnosticul dermatomicozelor superficiale și anume, în precizarea mai ales a naturii *microsporice* a micozei regiunii păroase sau a precizării diagnosticului de *Pitiriazis versicolor* neobservat la examenul obișnuit. Metoda se bazează pe proprietatea pe care o au produsele parazitate de anumite specii dermatofitice, din grupa celor care provoacă mi-

crosporia şi mai puţin favusul, la om sau animal, de a prezenta o luminiscenţă verzuie-strălucitoare la razele ultraviolete (lumina Wood). Acest fenomen se obţine cu ajutorul unor filtre speciale formate dintr-o sticlă în compoziţia căreia intră 9—10% săruri de oxid de nichel, care nu lasă să treacă decît razele ultraviolete invizibile, cu lungime de undă mică (3650 Å), singure capabile să producă fluorescenţa produselor luminate. Filtrele semnalate se pot prezenta, fie sub forma unor ecrane (ecrane Wood) — care se adaptează la o lampă obişnuită de ultraviolete, portabilă sau de staţionar, fie sub forma unor becuri speciale („cu lumină neagră'' din sticlă Wood, ce conţin un mic tub de cuarţ cu vapori de mercur — lampa neagră Ma 300). Fenomenul fluorescenţei se observă numai la camera obscură, fiind asemănător imaginii pe care o dau licuricii sau cadranele fosforescente în întuneric. Se dă drumul sursei de ultraviolete, pentru încălzire, timp de cîteva minute, apoi se introduce bolnavul de examinat în camera obscură, privind cu atenţie regiunile de examinat, care trebuie să fie foarte apropiate de lumina Wood. Luminiscenţa cea mai caracteristică o dau perii parazitaţi, microsporici, care pot să fie descoperiţi chiar cînd parazitarea este limitată la un singur fir de păr, invizibil la lumina obişnuită, cu ochiul liber şi care poate deci să scape recoltării şi examenului direct. Fluorescenţa perilor favici este, potrivit părerii unor autori, mai palidă şi nu prezintă o valoare de luat în consideraţie.

Metoda examinării cu lampa Wood este deosebit de preţioasă în cazul unui control masiv epidemiologic al colectivităţilor, în care s-a semnalat izbucnirea unor focare singulare sau epidemice de microsporie (ea permiţînd un diagnostic rapid şi sigur al cazurilor suspecte şi invizibile clinic), precum şi ca mijloc de control al vindecării cazului (semnalînd prezenţa încă a perilor parazitaţi fluorescenţi). La fel de utilă este pentru depistarea aceleiaşi microsporii la animalele (pisici, cîini etc.) care au servit drept sursă probabilă de contaminare şi la care examenul direct nu poate să aducă totdeauna precizări.

Încă un amănunt de reţinut este acela că bolnavii nu pot să fie examinaţi la lumina Wood, dacă li s-a aplicat în prealabil un tratament cu diverse pomezi sau substanţe antifungice şi antibacteriene, care pot să mascheze fluorescenţa (excepţie face doar soluţia de acid acetic glacial). De aceea se recomandă înlăturarea acestora (prin spălare îngrijită), cu cel puţin o zi înainte de a fi supuşi acestei examinări.

În celelalte forme de micoze, fluorescenţa nu-şi găseşte aplicare.

2. **Intradermoreacţia** la antigene specifice este o metodă de diagnostic, nu dintre cele mai fidele, care caută să pună în evidenţă răspunsul alergic, conflictul antigen-anticorp, al organismului în faţa agresiunii agentului micotic. Procedeul constă în injectarea intradermică (realizînd o papulă) a 1—2 diviziuni din antigenul specific folosit — de obicei pe faţa anterioară a antebraţului — şi citirea eventualei reacţii, care are loc după un interval de timp ce variază de la cîteva ore la cîteva zile (2—5).

Substanţele produse de ciuperci şi care sînt dotate cu putere antigenică crescută, pot să difuzeze în mediul de cultură sau să rămînă cantonate în interiorul miceliului sau al organelor de fructificare. De aceea, în general, se folosesc în acest scop culturile mai vechi, maturizate ca dezvoltare, care pot să includă toate aceste posibilităţi. Rareori se utilizează, pentru unele specii, culturi mai apropiate din punct de vedere morfologic, de forma parazitară.

Pentru antigenii care difuzează în mediul de cultură, prepararea lor se reduce, în cazul cel mai simplu, la filtrarea mediului cu cultura pură dezvoltată, avînd grijă însă să se elimine (prin diverse procedee), fracţiunile proteice capabile să dea reacţii nespecifice. În acest scop, unii autori indică folosirea de medii sintetice, care nu au în compoziţia lor proteine ce ar putea să dea astfel de reacţii, dar care permit dezvoltarea mozaicului antigenic. Se pare că aceste medii au dat satisfacţie celor care le-au utilizat.

În cazul antigenelor intracelulare, s-au propus diferite tehnici de preparare a lor, căutînd să se obţină produse antigenice cît mai pure.

Nu vom intra în detaliile diverselor tehnici de preparare a antigenelor micotice folosite în practica micologică, ele găsindu-se la nevoie în orice tratat de micologie medicală. Menţionăm doar că, pentru diagnosticul de laborator, cele mai folosite antigene sînt cele preparate din ciupercile care provoacă micozele superficiale supurate şi anume din grupa tricofitonelor şi din grupa ciupercilor levuriforme, respectiv *tricofitina* şi *levurina*. Antigenele ciupercilor care provoacă micozele profunde sînt mai puțin folosite (cel puțin la noi în țară), dată fiind și raritatea răspîndirii lor, precum și valoarea inconstantă a intradermoreacțiilor în aceste cazuri.

Pentru prepararea *tricofitinei* se folosesc în general una sau mai multe specii de dermatofiți, îndeosebi cele bogate în organe de fructificare (din grupa *Tricophyton gypseum* mai ales). Tehnicile de extragere a antigenului sînt relativ simple și au cam aceeași valoare. Dăm ca mai întrebuințate următoarele:

a) *Metoda Bruno-Bloch:* cultura de 2—3 luni pe mediul lichid Sabouraud se congelează cu zăpadă carbonică, se pulverizează, se triturează; după ce a stat 24 de ore în contact cu bulionul de cultură, se filtrează și se adaugă 0,25% acid fenic.

b) *Metoda Boivin-Mesrobeanu*, potrivit indicațiilor lui S. Longhin (folosită în țara noastră încă din 1936): culturi tinere, de 2—3 săptămîni, se triturează cu soluție clorurată izotonică, se tratează cu acid tricloracetic N/2, se lasă cîteva ore la gheață, se centrifughează și se supun la dializă 2 zile, în saci de colodiu. Se usucă în vid, obținîndu-se tricofitina în stare solidă, care poate să fie folosită în concentrația dorită.

c) *Metoda Soru:* masa miceliană a unei culturi de 5—6 săptămîni este supusă deshidratării în acetonă, timp de 1—2 zile, apoi se usucă și se triturează. Praful obținut se dizolvă în apă distilată, în proporție de 1/9, se sterilizează la 80°, timp de o oră și apoi se centrifughează de 3 ori la 5 000 de turații, timp de 15—20 de minute. Supernatantul se dializează 2 zile la apă curgătoare, apoi o zi la apă distilată și apoi se usucă. Din preparatul uscat putem să preparăm concentrația dorită.

Practicarea intradermoreacției la tricofitină se face intradermic, injectînd cu o seringă sterilă de 1 cm^3 0,2 ml în pielea regiunii antebrațului. Se recomandă să se facă concomitent și intradermoreacția cu ser fiziologic ca martor. Citirea reacției se face după 48 de ore, cînd poate să apară la locul injecției o placă eritematoasă, chiar veziculoasă, mai mult sau mai puțin infiltrativă, în funcție de intensitatea reacției. În funcție de tipul de leziune obținut notăm intensitatea ca pozitivă (+++) pentru un placard eritematos infiltrat, de 1—2 cm diametru și intens pozitivă (++++) pentru un placard eritematoveziculos, uneori chiar edematos, de dimensiuni mai mari. Reacțiile slab pozitive, trecătoare, nu sînt de luat în considerație. În cazul unei reacții intense putem să întîlnim și fenomene generale (rare) ca: curbatură, cefalee, stare febrilă și uneori, o exacerbare a focarelor existente de boală (reacție de focar), cu apariția unor mici leziuni diseminate în vecinătate sau alte regiuni ale corpului („tricofitide").

Există uneori și reacții imediate, la 20—30 de minute după injecție, însă valoarea acestora este discutabilă.

Se poate găsi o reacție pozitivă chiar și după 10 ani de la infecția care a provocat-o.

În general, o reacție pozitivă și mai ales intens pozitivă la tricofitină are o semnificație diagnostică, în cazul micozelor de tip inflamator, putînd să constituie un ajutor mai ales atunci cînd nu s-a putut pune în evidență prezența paraziților micotici. În micozele superficiale este negativă și nu se recomandă să fie folosită.

Levurina este antigenul preparat dintr-un filtrat steril de cultură de *Candida albicans*, crescută 3 luni pe bulion maltozat. Pentru extragerea levurinei se pot folosi aceleași tehnici ca la prepararea tricofitinei.

Practicarea intradermoreacției se face în același mod ca la tricofitină, tot cu martor, respectînd cu strictețe precauțiile de asepsie necesare.

Efectuarea intradermoreacției la levurină, ca de altfel și la tricofitină, trebuie să respecte anumite indicații: să se utilizeze o seringă gradată în diviziuni, care să fie afectată numai acestui scop; injecția să se facă strict intradermic, cu un ac fin, de 0,5 mm diametru, cu bizoul scurt; să fie făcută și o intradermoreacție cu ser fiziologic drept martor.

Rezultatele intradermoreacției la levurină pot să fie și ele: a) reacție *imediată* de tip urticarian, la 20—30 de minute; uneori se șterge, alteori trece în b) reacție de *tip tuberculinic* (48—72 de ore); c) reacție *întîrziată* (la 5—7 zile).

În cazul levurinei se ține mai mult seama de intensitatea și persistența reacției, avînd o valoare mai mare reacțiile de tip tuberculinic, care apar după 2—4 zile și care pot să persiste chiar 1—2 săptămîni. Valoarea specifică a intradermoreacției la levurină este încă contestată.

Factorii care influențează rezultatele intradermoreacției sînt: condițiile de efectuare (arătate mai sus), concentrația levurinei utilizate în acest scop (unii autori preferă întrebuințarea diluției 1/5000, concentrațiile mai mari fiind dezagreabile pentru bolnav), iar uneori însuși produsul levurinei. S-au observat unele variații în rezultatele date de loturi de levurină preparate după diverse metode.

O altă cauză de eroare în interpretare a intradermoreacției stă în fenomenul descris de Rinkel sub numele de „flash response": un bolnav căruia i s-a practicat prima dată intradermoreacția la levurină prezintă o reacție pozitivă; cînd intradermoreacția este repetată după un anumit interval, în aceeași concentrație, ea poate fi mai puțin intensă sau chiar negativă. Este necesară o concentrație superioară pentru obținerea unui nou răspuns pozitiv.

În ce privește celelalte reacții imunologice, seroreacții, ca reacții de floculare și aglutinare, reacții de fixare a complementului etc., acestea sînt mult mai puțin sau aproape de loc folosite în diagnosticul micologic; ele dau rezultate neconcludente, din cauza specificității lor, care poate să fie falsificată de fenomenele de imunitate încrucișată.

În ceea ce privește *Candida* mai ales — cercetarea aglutininelor, de exemplu — nu e concludentă, prezența lor putînd să traducă un simplu saprofitism de *Candida*. Aglutininele există și în mod normal în numeroase seruri umane. Aceste reacții nu au decît cel mult valoare prezumtivă. Ele trebuie comparate și coroborate cu examenele microscopice și eventual, cu intradermoreacțiile.

Reacțiile de imunofluorescență nu dau nici ele rezultate satisfăcătoare în candidoze.

Numai reacțiile de fixare a complementului par să aibă o semnificație mai precisă în candidoze, prezența lor avînd o oarecare specificitate, mai ales în cazurile generalizate. Ele sînt rar pozitive în cursul unor candidoze superficiale, localizate, chiar cînd sînt mai vechi.

3. **Inocularea experimentală** la animale de laborator este un element de diagnostic care se aplică mai ales în aprecierea patogenității unei specii izolate dintr-o leziune micotică și mai rar în identificarea ei.

Pentru dermatofiți, inoculările se fac la suprafața pielii. Animalul de elecție este cobaiul și șoarecele alb. Ca regiune de inoculare se alege de obicei spatele sau flancurile. Acestea sînt în prealabil depilate manual (la șoarece destul de ușor), fie cu ajutorul unei paste epilatoare (de exemplu: sulfură de sodiu 15% în talc). Pe suprafața astfel depilată și scarificată ușor cu glaspapir, se depune o mică porțiune din cultura de inoculat, triturată în prealabil cu o cantitate de mediu sau de miere. Totul se acoperă cu benzi de leucoplast. La aceste inoculări, cultura trebuie să fie tînără, de dată recentă și pură, neinfectată. De asemenea, animalele să fie ținute separat, fiecare în cîte o cușcă sau recipient.

Rezultatele inoculării se citesc după 5—7 zile, uneori și mai tîrziu. În caz de răspuns pozitiv, se observă o suprafață roșiatică, presărată cu scuame-cruste, pruriginoasă, mai mult sau mai puțin inflamatoare. Perii pot să fie și ei prinși după tipul ectotrix sau endotrix. Însămînțările practicate din leziunea provocată experimental, trebuie să reproducă cultura inițial inoculată.

În practică, inoculările pentru dermatofiți se fac mai mult în scopul precizării anumitor specii. Astfel, inocularea *Tr. quinckeanum* la șoarecele alb provoacă în mod obligatoriu apariția de godeuri tipice.

Pentru aprecierea patogenității speciilor din grupul *Candida* se folosește inocularea intravenoasă în vena marginală a urechii iepurelui, animalul de elecție în acest caz. Mai rar, se utilizează vena cozii la șobolan și chiar vena dorsală a penisului la cobai. Se inoculează 0,5 ml dintr-o cultură de *Candida* de 48 de ore (un vîrf de ansă în 10 ml ser fiziologic). Inoculările pozitive provoacă moartea animalului după 3—5 zile, prin fenomene de septicemie generalizată.

Pentru speciile care dau micoze profunde se întrebuințează mai ales calea subcutanată și intraperitoneală la cobai, șobolan, hamster. Rareori se folosește și calea intratesticulară.

ANTIBIOGRAMA FUNGICĂ

De multe ori, în practica de laborator micologic, sîntem puși în situația de a încerca puterea antifungică a unei substanțe date sau de a testa sensibilitatea unor tulpini de ciuperci patogene față de medicamentele antifungice pe care ne propunem să le folosim ca mijloc de tratament.

Antibiograma fungică trebuie să țină seama, în primul rînd, de alegerea mediului de cultură cel mai favorabil dezvoltării ciupercii, în al doilea rînd, de consistența coloniilor (care pot forma suspensii omogene sau neomogene în mediul lichid) și în sfîrșit, de solubilitatea substanțelor de încercat.

Principiul general de la care se pornește în aprecierea acțiunii fungistatice sau fungicide a unui antibiotic sau chimioterapic de cercetat, se bazează pe încorporarea acestuia în mediul de cultură solid sau lichid și urmărirea dezvoltării ciupercii însămînțate, comparativ cu dezvoltarea acesteia pe mediul martor, fără substanța testată.

Tehnica efectuării antibiogramei variază în funcție de particularitatea unei culturi de a forma sau nu suspensii omogene în apă. Din acest punct de vedere, tehnica folosită pentru antibiograma ciupercilor levuriforme (ciupercile din grupul *Candida*) este cea mai simplă, deoarece se aplică metoda difuzimetrică pe plăci de geloză, identică cu cea propusă de Heatley pentru titrarea puterii antibiotice în bacteriologie.

Procedeul este următorul: se întinde pe suprafața mediului de cultură solid dintr-o cutie Petri, cu ajutorul unui tampon de vată steril (tampoane folosite pentru recoltarea exsudatelor faringiene), o suspensie în ser fiziologic sau apă distilată din ciuperca levuriformă, izolată în stare pură. Suspensia de cultură, pregătită extemporaneu, se întinde cu tamponul în mod uniform, în linii perpendiculare, pe toată suprafața mediului. După cîteva minute, necesare pentru uscarea suspensiei, se aplică rondele sterile de hîrtie îmbibate în diferite concentrații din substanța pe care vrem să o testăm. Rezultatele se citesc după 1—3 zile (în funcție de rapiditatea dezvoltării culturii), apreciind puterea fungistatică a substanței pe baza diametrului ariei de inhibiție a dezvoltării ciupercii din jurul rondelelor. Pentru substanțele care nu sînt hidrosolubile — de exemplu *micostatina* — folosim o metodă, modificată de Balș, care înlocuiește rondelele cu o cantitate foarte mică din pulberea de antibiotic amestecată cu amidon steril, în diverse proporții (1/10—1/20—1/50 etc.).

Aceasta este o antibiogramă *calitativă*.

Pentru celelalte tipuri de ciuperci, ale căror culturi nu formează suspensii omogene în mediile lichide și care nu se pot deci dezvolta uniform pe mediul cu geloză din cutiile Petri, se poate folosi următoarea tehnică:

În cîteva tuburi de hemoliză, sterile, de 12/60 mm se pun cu o pipetă de 1 ml cantitățile de soluție corespunzătoare la diverse diluții din antibioticul de încercat, măsurînd cantitățile cu 1/10 ml, fără a depăși volumul de 0,5 ml prin diluții zecimale succesive ale soluției mamă.

Se va completa apoi în fiecare tub cantitatea de lichid pînă la 0,5 ml, adăugind cu pipeta apă distilată sterilă (tabelul 147).

TABELUL 147

	Soluția măsurată	Apă distilată care completează	Diluția obținută
Soluția mamă 1/100	0,5	—	1/200
	0,2	0,3	1/500
	0,1	0,4	1/1 000
Diluția 1/10 din soluția mamă	0,5	—	1/2 000
	0,2	0,3	1/5 000
	0,1	0,4	1/10 000
Diluția 1/100 din soluția mamă	0,5	—	1/20 000
	0,2	0,3	1/50 000
	0,1	0,4	1/100 000
Diluția 1/1 000 din soluția mamă	0,5	—	1/200 000
	0,2	0,3	1/500 000
	0,1	0,4	1/1 000 000

Pentru ciupercile care se dezvoltă bine și în mediul lichid, se vor adăuga în fiecare tub cîte 0,5—1 ml din acest mediu, pe care se va însămînța apoi tulpina de ciupercă care ne interesează.

Pentru speciile care se dezvoltă mai bine pe mediile solide se vor pregăti capsule de sticlă (de 8/20 mm diametru), care se așază în cerc într-o cutie Petri, pe cîteva rînduri de hîrtie de filtru, în jurul unui disc central gros, pentru a evita deplasarea capsulelor. Amintim că cutiile Petri trebuie să fie sterilizate în prealabil.

Mediul de cultură ales este lichefiat în baia de apă; apoi cu o pipetă sterilă, prevăzută cu un tub aspirator de cauciuc, se iau 0,5 ml de mediu, se introduc în primul tub de hemoliză care conține diluția antibioticului, se amestecă pe loc, se aspiră amestecul și se varsă în prima capsulă. Se procedează apoi repede cu celelalte diluții în capsulele următoare. Se lasă să se răcească mediul din capsule, acoperindu-le cu capacul cutiei Petri. Se însămînțează apoi în mijlocul mediului solidificat un mic fragment de cultură, cu vîrful ansei de platină. Se închid din nou cutiile, după ce am umezit hîrtia de filtru pe fundul lor cu cîțiva ml de apă distilată sterilă.

Se lasă cutiile la temperatura optimă de dezvoltare a speciei însămînțate, pînă la dezvoltarea culturii martor (fără antibiotic). După cîteva zile începe citirea rezultatelor, care sînt uşor de apreciat după determinarea diluţiei limită, care a împiedicat apariţia culturii.

În genere este bine să realizăm calculul diluţiilor substanţei antifungice în funcţie şi de concentrarea aproximativă care se poate obţine în sînge, prin administrarea dozelor, terapeutice ale acesteia.

Metoda antibiogramei este aplicabilă atît substanţelor hidrosolubile, cît şi celor emulsionabile.

Efectuarea antibiogramei fungice este de mare importanţă pentru aplicarea tratamentului cel mai potrivit, mai ales în micozele profunde.

Examenul direct din produsul patologic *TABELUL 148*

Materialul examinat			Elemente fungice observate	Rezultatul examenului microscopic	Boala pe care o provoacă
1			2	3	4
Peri	Tip de parazitare	Endotrix	Spori mari, dreptunghiulari sau rotunzi, dispuşi în lanţuri strînse, drepte, în *interiorul* părului; aspect de „sac de nuci"	Peri parazitaţi de *Tricophyton endotrix*	Tricofiţie superficială a pielii capului sau bărbii
			Filamente miceliene rare, puţin septate, în *interiorul* părului, mai ales către margine; grămezi izolate de artrospori	Peri favici	Favus
		Ectotrix	Spori mici, rotunzi, dispuşi în manşon, la *exteriorul* firului de păr, fără arhitectonică precisă. În interior: filamente subţiri, rare, puţin septate	Peri microsporici	Microsporie
			Spori mici aşezaţi în lanţuri la exteriorul firului de păr. Miceliu intrapilar format din lanţuri lungi de articole miceliene scurte	Peri parazitaţi de un *Tricophyton microid*	Tricofiţie supurată a pielii capului sau bărbii
			Filamente şi spori mari, globuloşi (uneori cu dublu contur) în exteriorul şi uneori în interiorul firului de păr	Peri parazitaţi de un *Tricophyton megaspor*	Tricofiţie supurată a bărbii, mai rar a pielii capului
Scuame			Filamente miceliene izolate sau ramificate, în general puţin septate; nu respectă limitele celulelor cornoase	Filamente miceliene	Micoză cutanată (herpes circinat, epidermofiţie etc.)
			Celule mici, rotunde, parte din ele înmugurite, dispuse în grămezi, izolate sau pe ramurile unui pseudomiceliu	Celule levurice (izolate sau în cuiburi) şi pseudomicelii	Candidoză cutanată (eroziuni interdigitale, intertrigo etc.)
			Filamente miceliene scurte, ondulate, uşor fragmentate şi ciorchini de spori rotunzi	Filamente şi spori de *Malasezia furfur*	Pitiriazis versicolor
			Filamente foarte subţiri, drepte sau torsionate, grupate în fascicule, uneori elemente în formă de bastonaşe şi coci	Filamente subţiri de *Nocardia minutissima*	Eritrasmă

TABELUL 148 (continuare)

Materialul examinat	Elemente fungice observate	Rezultatul examenului microscopic	Boala pe care o provoacă
1	2	3	4
Unghii	Filamente miceliene izolate, mai mult sau mai puţin abundente, uneori septate în artrospori	Filamente miceliene	Onicomicoză
	Celule rotunde înmugurite, în cuiburi şi pseudomicelii sau filamente miceliene.	Celule levurice şi pseudomicelii	Onixis şi perionixis cu levuri
Secreţie vaginală	Pseudomicelii mai mult sau mai puţin numeroase, cu celule rotunde înmugurite	Celule levurice şi pseudomicelii	Candidoză vaginală (vaginită cu Candida).
Spută Expectoraţie	Celule levurice, înmugurite şi pseudomicelii în cantitate abundentă	Celule levurice şi pseudomicelii (au valoare numai dacă se găsesc în cantitate foarte mare)	Candidoză pulmonară.
	Filamente miceliene segmentate în celule dreptunghiulare sau artrospori dreptunghiulari izolaţi	Elemente de *Geotrichum*	Geotricoză (foarte rară).
	Filamente ramificate, lungi, cu spori mici, verzi-cenuşii, dispuşi în grămezi	Elemente de *Aspergillus*	Aspergiloză pulmonară (rar întîlnită).
Exsudate din cavitatea bucală (depozite de pe limbă, amigdale etc.)	Celule rotunde, înmugurite şi pseudomicelii	Celule levurice şi pseudomicelii	Candidoză a mucoasei bucale (muguet, glosită, perleş etc.).
	Filamente subţiri ca nişte fire de aţă, uneori fragmentate în elemente cocciforme.	Filamente subţiri de *Leptotrix*	Leptotrix amigdalian
	Celule rotunde sau ovale, cu membrana groasă, cu dublu contur (foarte rar).	Celule levurice de *Cryptococcus*	Criptococoză (blastomicoză cu focare multiple).
Grunji (din puroi) Albi-gălbui	Filamente subţiri, neseptate, ramificate, cu coroană radiară de elemente în formă de măciucă	Grunji de *Actinomyces israeli*	Actinomicoză
	Filamente fine, neseptate, fără măciuci	Grunji de *Nocardia*	Micetom actinomicotic
Negri	Filamente groase, septate, înglobate într-o substanţă amorfă, uneori cu clamidospori	Grunji de ciuperci adevărate (*Fungi imperfecti* sau *Ascomicete*)	Micetom cutanat fungic

TABELUL 149

Tabloul identificării speciilor de ciuperci care provoacă micozele profunde

Clasa din care fac parte	Specia	Gazda principală	Prelevări de produs	Aspectul în materialul patologic	Mediul propice pentru dezvoltarea culturii și temperatura	Morfologia culturii		Boala pe care o provoacă (semne principale)
						Macroscopic	Microscopic	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Actinomycete Anaerob	*Actinomyces israeli*	Om (saprofit al cavității bucale)	Grăunți mici neregulați, uneori aglutinați în masă Biopsie	Filamente miceliene subțiri, neseptate, uneori cu extremitatea în măciucă	Tarozzi și geloză Veillon 37°	Mici colonii albicioase, fin pufoase	Filamente fine, foarte subțiri, neseptate. Fragmentări în elemente baciliforme	*Actinomicoză* Tumori dure, lemnoase, fistulizate în regiunea cervicofacială sau fesieră. Mai rar localizare pulmonară sau abdominală
Aerob	*Nocardia madurae*	Sol (inoculare la om prin traumatism)	Grăunți — ca la anaerobi Biopsie	Filamente fine, neseptate, fără măciuci	Sabouraud 37°	Colonii cerebriforme, culoare albă-cenușie, șocolatie, consistență elastică	Idem (ca mai sus)	*Micetom actinomicotic* Nodozități tumorale, dure, cu traiecte fistuloase multiple, cu deformarea labei piciorului sau gambei.
Ascomycete	*Allescheria boydii* (*Monosporium apiospermum*)	Sol (inoculare la om prin traumatism).	Grăunți mici, albi-gălbui. Biopsie	În grunji, filamente în rețea și clamidospori mari	Sabouraud 37°	Colonii pufoase, ca lîna, culoare albă-cenușie, apoi măslinie. Cu timpul aspect încrețit.	Miceliu septat, ramificat. Spori terminali, piriformi, la extremitatea unui filament	*Micetom fungic* cu grăunți mici, moi, localizat la laba piciorului
Fungi imperfecti sau *Adelomycete* sau *Deuteromycete* sau *Hyphomycete*	*Madurella mycetomi*	Nu se cunoaște încă (probabil solul).	Grăunți negri. Biopsie	Grunji formați din miceliu segmentat în articole neregulate. Clamidospori mari	Sabouraud 37° și la temperatura camerei	Colonii rotunde, albe-cenușii, apoi brune, cu pigment difuzibil în mediu. Pe mediul P.C. apar sclerote	Miceliu gros, neregulat, clamidospori mari în culturile vechi	*Maduromicoze* (picior de Madura). Micetomul cu grunji negri. Noduli ulcerați, fistuloși. Puroi cu grunji negri, duri.
	Sporotrichum schenckii	Sol (inoculare prin traumatism)	Puroi. Biopsie	1) Celule rotunde sau ovalare. 2) Corpi asteroizi	Sabouraud și la 37° temperatura camerei	Colonii albe, cremoase, netede, apoi plisate, culoarea variază de la galbenă-șocolatiu la brună	Filamente septate și ramificate cu grupuri de spori oval sau sferici, bruni, pe ramurile laterale sau la capătul miceliului	*Sporotricoză* Gome subcutanate unice sau multiple, ulcerate, de obicei pe un traiect limfatic.
	Aspergillus fumigatus	Sol	Spută. Exsudat din ureche. Puroi	Spori mici, rotunzi, de culoare verzuie-brună. Filamente fragmente	Sabouraud temperatura camerei	Colonii albe, lînoase, apoi netede de culoare verzuie-neagră	„Capetele aspergilare"	*Aspergiloză* — pulmonară — auriculară (otomicoza aspergilară) — oculară — comisală
	Coccidioides immitis	Sol	Puroi, spută, conținut gastric, l.c.r.	Corpi rotunzi, cu pereți groși, ce conțin endospori mici. Uneori aspect echinulat	Sabouraud temperatura camerei	Colonii albe-cenușii, cu miceliu aerian lînos.	Artrospori dreptunghiulari, în lanț. În cloral-lacto-fenol, spații întunecate alternînd cu spații clare. Clamidospori în culturile vechi	*Coccidioidomicoză* — forme cutanate de tip abces, gomă, cu evoluție spre ulcerație. — Forme pulmonare de tip pneumonie sau bronhopneumonie

TABELUL 149 (continuare)

Clasa din care fac parte	Specia	Gazda principală	Prelevări de produs	Aspectul în materialul patologic	Mediul propice pentru dezvoltarea culturii și temperatura	Morfologia culturii		Boala pe care o provoacă (semne principale)
						Macroscopic	Microscopic	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fungi imperfecti sau *Adelomycete* sau *Deuteromycete* sau *Hyphomycete*	*Histoplasma capsulatum*	Sol	Frotiu din sînge sau măduva sternală, biopsie ganglionară	Nimic caracteristic	Sabouraud 37° și la temperatura camerei	Colonii pufoase, albe, cu miceliu aerian ce se închide la culoare	Clamidospori mari, tuberculați, rotunzi sau piriformi, cu perete gros	*Histoplasmoză* Reticuloză cu febră, anemie, hepato-splenomegalie sau sindrom pulmonar hemoptoic
	Cryptococcus neoformans	Sol	— l.c.r. — spută — puroi	Celule rotunde sau ovoide, cu dublu contur, înconjurate de o capsulă gelatinoasă	Sabouraud 37° și temperatura camerei	Colonii vîscoase, strălucitoare, culoare maro-brună. Colonii albe-crem, încrețite	Celule înmugurite cu tub germinativ, terminal, scurt	*Criptococoză* (sindrom meningian sau tumoral cerebral).
	Geotrichum candidum	Sol	— spută — fecale	Celule rotunjite și dreptunghiulare	Sabouraud temperatura camerei	Colonii albe-cenușii, netede, cu periferia fin încrețită	Artrospori dreptunghiulari, izolați sau în lanțuri scurte	*Geotricoză*
	1) *Phialophora verrucosa* 2) *Phialophora pedrossi* 3) *Cladosporium species*	Sol (inoculare prin traumatism)	— biopsie — scuame	Celule „fumagoide" de culoare verzuie-brună	Sabouraud 37° sau 30°	Colonii mamelonate, netede, de culoare verde-brună sau negricioasă, cu reversul negru	Diferit pentru cele trei specii în parte	*Cromomicoză* sau dermatită verucoasă cromomicotică. Tumori nodulare verucoase.

TABELUL 150

Identificarea speciilor de dermatofiți

Denumirea speciei		Gazda principală	Caractere morfologice		Tipul de leziuni pe care le provoacă (la om) în ordinea frecvenței în țara noastră	Modul de parazitare a perilor
			Macroscopice	Microscopice		
1		2	3	4	5	6
Genul Tricophyton	*Tricophyton violaceum*	Om	Cultură netedă ușor proeminentă, aderentă de mediu, culoare violetă	Miceliu ramificat, septat în articole scurte, neregulate. Clamidospori mari. Aleurii variate.	Tricofiție superficială a pielii capului Tricofiție cronică a adultului (cu puncte negre). Onicomicoze (însoțesc tricofiția cronică) Herpes circinat Tricofiții ale bărbii (rare)	Endotrix
	Tricophyton tonsurans	Om	Cultură fin prăfoasă, cerebriformă sau crateriformă, culoare gălbuie prin transparență	Aleurii ovalare, relativ numeroase. Fusuri rare, alungite, rotunjite la capăt	Tricofiție superficială și infiltrativă a bărbii Herpes circinat al feței Tricofiție superficială a pielii capului Mai rar, leziuni de tip supurat ale regiunilor păroase	Endotrix

TABELUL 160 (continuare)

Denumirea speciei		Gazda principală	Caractere morfologice		Tipul de leziuni pe care le provoacă (la om) în ordinea frecvenţei în ţara noastră	Modul de parazitare a perilor
			Macroscopice	Microscopice		
1		2	3	4	5	6
Genul Tricophyton	*Tricophyton schoenleini*	Om	Colonie proeminentă, zbîrcită, friabilă, culoare gălbuie-cenuşie, ceroasă. Uneori aspect vermiculat. cerebriform	Filamente miceliene cu aspecte mai particulare de „coarne de cerb", „candelabre" ; clamidospori variabili ca formă (aspect de cuie).	Favusul pielii capului (forme : cu godeuri, pitiriazică. impetigoidă). Onicomicoze	Endotrix
	Tricophyton rubrum	Om	Cultură fin prăfoasă sau pufoasă, culoare variabilă de la alb pînă la roz-roşie purpurie. Pigmentul apare de obicei pe dosul coloniei, alteori pe sectoare	Filamente ramificate, segmentate în articole scurte. Aleurii în acladium sau ciorchine mici. Organe nodulare	Epidermofiţie de tip uscat, mai ales în reg. plantare şi palmare. Onicomicoze Epidermofiţii inghinale Leziuni cutanate cronice Rareori tricofiţii ale regiunilor păroase (barbă sau pielea capului)	Parazitează rar perii endotrix sau ectotrix
	Tricophyton mentagrophytes (varianta *interdigitale*. Kaufman-Wolf).	Om	Cultură pufoasă, albă, cu timpul capătă aspect fin prăfos. Acoperă repede suprafaţa mediului de cultură	Aleurii numeroase, rotunde în ciorchini simplu sau compuşi. Spire sau ramificaţii în coarne de cerb Fusuri rare în formă de suveică	Epidermofiţie dishidrotică palmoplantară şi interdigitală Onicomicoze (însoţesc o parte din epidermofiţii) Epidermofiţie inghinală (mult mai rar).	Nu parazitează perii
	Tricophyton mentagrophytes (varianta *Tr. gypseum*)	Animale : *şoarece, cobai*, cal etc. Sol (?)	Cultură gipsoasă, de culoare albă. Se desprinde uşor de mediu	Aleurii numeroase, rotunde, în masă compactă. Fusuri cu baza largă, extremitatea obtuză, cu unul sau mai multe septuri. Frecvente vrile sau terminaţii în coarne de cerb	Tricofiţie supurată a pielii capului şi bărbii (*Kerion Celsi*) Tricofiţii uscate ale pielii capului (mai rar) Herpes circinat inflamator	Ectotrix, microid
	Tricophyton verrucosum	Animale : *viţei*, vaci, cai, capre, oi etc.	Colonie de aspect faviform (vezi *Tr. schoenleini*), vermiculat, culoare gălbuie-ceroasă, cu aureolă prăfoasă albă	Miceliu septat în articole neregulate. Clamidospori mari, neregulaţi, de obicei intercalari, uneori giganţi	Leziuni eritematoscuamoase, circinate, cu marginea inflamatoare confluente prin diseminare (aspect de hartă geografică) Tricofiţii supurate, cu evoluţie mai lungă, ale bărbii, mai rar pe pielea capului Tricofiţii uscate, de tip tondant (rar)	Ectotrix megaspor
	Tricophyton quinckeanum	Animal ; şoarece alb, pisică. — sol (?)	Colonie rotundă cu praf scurt, de culoare albă, uneori cu depresiune centrală, periferic cu franjuri scurte în mediu	Aleurii piriforme, ovalare, aşezate în acladium Fusuri numai la unele tulpini	Herpes circinat cu sau fără godeuri Rar, în regiunile păroase : sicozis subinflamator sau *Kerion Celsi* al pielii capului	rar : — ectotrix, microid ; — endotrix tip favic

TABELUL 150 *(continuare)*

Denumirea speciei		Gazda principală	Caractere morfologice		Tipul de leziuni pe care le provoacă (la om) în ordinea frecvenței în țara noastră	Modul de parazitare a perilor
			Macroscopice	Microscopice		
1		2	3	4	5	6
Genul Tricophyton	*Tricophyton gallinae*	Animal: păsări de curte (cocoș, găini)	Colonie asemănătoare cu *Tric. quinckeanum*. În plus, pigment roz-smeuriu care difuzează în mediu	Acelaşi aspect microscopic ca la *Tr. quinckeanum*	Herpes circinat Foarte rar leziuni pilare (pielea capului) (specie rar întîlnită)	Foarte rar — endotrix
	Tricophyton equinum	Animal: cal	Colonie albă, pufoasă, uşor cutată	Aleurii frecvente, variabile ca formă. Uneori miceliu în rachetă	Herpes circinat Foarte rar tricofiție supurată a bărbii (specie rar întîlnită)	Ectotrix, megaspor (?)
	Tricophyton terrestre	Geofil: sol	Cultură de aspect granulos, plată, culoare gălbuie (oarecum asemănătoare cu *Tr. gypseum*).	Fusuri numeroase, de formă cilindrică, de loc sau puțin septate Aleurii sferice sau piriforme. Spire strînse	Nepatogen pentru om (saprofit relativ frecvent în pămînt)	Nepatogen
Genul Microsporum	*Microsporum audouini*	Om	Cultură fin pufoasă, rotundă, cu un mic buton central, culoare roz prin transparență	Filamente miceliene ramificate, septate Aleurii piriforme, nu prea abundente	Microsporie uscată a pielii capului Herpes circinat discret	Ectotrix (tip microsporic) Fluorescență la lampa Wood
	Microsporum ferrugineum	Om	Colonie netedă, uneori fin prăfoasă la suprafață. de culoare galbenă-deschisă pînă la ruginiu. Uneori aspect vermiculat	Filamente miceliene ramificate de culoare gălbuie. Numeroşi clamidospori rotunzi, intercalari sau în lanț	Microsporie uscată a pielii capului. Herpes circinat (rar)	Ectotrix (tip microsporic) Peri fluorescenți
	Microsporum canis	Animale: pisică, cîine etc.	Cultură pufoasă, cu puful lung, ce se ridică pe pereții eprubetei. Culoare galbenă-verzuie	Fusuri numeroase, lungi, ascuțite la capete, septate în multe loji	Herpes circinat (leziuni multiple) uneori inflamator; uneori în cercuri concentrice Microsporie uscată a pielii capului Microsporie a bărbii (foarte rar).	
	Microsporum gypseum	Geofil (sol)	Colonie plată, prăfoasă, de culoarea cafelei cu lapte. Zona marginală tivită de un lizereu alb-pufos	Fusuri numeroase, cu extremitatea ascuțită, peretele fin echinulat şi suprafața uneori grăunțoasă Micelii în rachetă Aleurii piriforme	Herpes circinat Mai rar micoze ale regiunilor păroase	Rar ectotrix Peri nefluorescenți

TABELUL 150 (continuare)

Denumirea speciei		Gazda principală	Caractere morfologice		Tipul de leziuni pe care le provoacă (la om) în ordinea frecvenţei în ţara noastră	Modul de parazitare a perilor
			Macroscopice	Microscopice		
1		2	3	4	5	6
Genul Microsporum	*Microsporum cookei*	Sol	Culturile asemănătoare cu ale *M. gypseum*, însă au un pigment roşu-purpuric pe revers	Acelaşi tip de fusuri ca la *M. gypseum*. Însă mai lungi şi cu perete mai gros	Nepatogen pentru om şi animal	
	Microsporum nanum	Om (?) Sol (?)	Colonii fine, gipsoase, plate, de culoare gălbuie-ocru	Fusuri mici numeroase, în formă de bec sau pară, neseptate sau numai cu 1—2 septuri	Microsporie a pielii capului (*Kerion Celsi*) Herpes circinat (a fost găsit numai în cîteva cazuri)	Ectotrix. Peri fluorescenţi la lampa Wood
Genul Epidermophyton	*Epidermophyton floccosum*	Om	Cultură plată, fin prăfoasă, de culoare galbenă-verzuie. Uneori aspect vermiculat	Fusuri numeroase în formă de măciucă, cu extremitatea liberă mai umflată, dispuse în buchet de 5—8 (banane) Clamidospori intercalari Uneori vrile Aleurii lipsă	Epidermofiţie inghinală Epidermofiţie interdigitală (mai rar) Onicomicoze	Nu parazitează perii
	Keratinomyces ajelloi	Sol	Colonii fin gipsoase, de culoare ocru, pigment roşu-acaju, care ajunge în mediu	Fusuri numeroase alungite, în formă de trabuc, cu numeroase loji	Nepatogen pentru om (?)	

Conf. NICOLAE CAJAL
Membru corespondent al Academiei R.P.R.

INFRAMICROBIOLOGIE

ASPECTE GENERALE PRIVIND DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFRAMICROBIOZELOR UMANE

Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane a făcut în ultimii ani progrese importante, datorită pe de o parte, punerii în valoare a unor reacții serologice, considerate în trecut nespecifice — și aceasta prin descoperirea unor metode și tehnici noi de preparare a antigenelor — iar pe de altă parte, datorită avîntului deosebit luat de culturile inframicrobiene și în special de cele realizate în culturi celulare *in vitro*.

Prin dezvoltarea și îmbunătățirea continuă a acestor din urmă metode, numărul bolilor de origine inframicrobiană care beneficiază de ajutorul laboratorului pentru diagnosticul curent a crescut considerabil, ducînd totodată la simplificarea și ieftinirea tehnicilor de diagnostic inframicrobiologic. Prin lărgirea activității sale, laboratorul de inframicrobiologie a ieșit astfel din cadrul îngust al cercetării științifice și a devenit un factor auxiliar indispensabil clinicienilor și epidemiologilor. El reușește astăzi nu numai să ajute diagnosticul diferențial, să precizeze un diagnostic etiologic cert și în consecință, uneori terapeutica adecvată, dar chiar să contribuie, prin izolarea și identificarea de noi inframicrobi, la stabilirea unor entități nosologice necunoscute în trecut, să ajute în mod practic combaterea și profilaxia celor mai numeroase boli infectocontagioase, într-un cuvînt să extindă considerabil domeniul inframicrobiologiei.

Datorită tuturor acestor progrese, practic, diagnosticul a devenit posibil pentru cea mai mare parte a inframicrobiozelor umane.

Incontestabil că, pentru unele din afecțiunile inframicrobiene diagnosticul este mai simplu, pentru altele mai complicat. Este adevărat totodată că în stadiul actual al cunoștințelor noastre precizarea diagnosticului etiologic se stabilește în unele afecțiuni mult prea încet pentru ca medicul curant să-și poată fundamenta atitudinea sa terapeutică pe rezultatul laboratorului. În unele cazuri, răspunsul inframicrobiologului parvine clinicianului chiar după ce bolnavul a părăsit vindecat clinica. În aceste situații este clar că contribuția laboratorului este folosită mai mult retrospectiv pentru instruirea clinicianului, pentru studii statistice etc.

Această situație — este adevărat, întîlnită din ce în ce mai rar — constituie încă o racilă a inframicrobiologiei practice, un obiectiv de rezolvat în primă urgență de specialiști.

Cu toate aceste lipsuri, trebuie știut că practic diagnosticul pentru marea majoritate a inframicrobiozelor umane se poate stabili cu precizie, iar metodele laboratorului de diagnostic virusologic trebuie urgent generalizate.

Este deci necesar, ca metodele curente și moderne de diagnostic să fie, pe de o parte cunoscute și cerute de practicieni, iar pe de altă parte stăpînite și executate curent și rapid de cadrele din laboratorul de diagnostic. În felul acesta se vor putea lua cele mai juste măsuri de tratament, de combatere și de prevenire a răspîndirii bolilor inframicrobiene.

Nu trebuie însă nici un moment să se creadă că omul de laborator singur, izolat, poate contribui în toate cazurile la stabilirea diagnosticului; de cele mai multe ori este necesară colaborarea cu clinicianul și cu epidemiologul.

În consecință, în stadiul actual al cunoștințelor noastre, diagnosticul unei inframicrobioze umane se bazează pe:

- examenul clinic;
- ancheta epidemiologică;

— examenele de laborator.

Dacă pentru unele infecții inframicrobiene este suficient numai unul din aceste procedee, pentru altele este necesară combinarea lor.

Cîteva cuvinte despre aportul și utilitatea fiecăruia din aceste procedee.

EXAMENUL CLINIC

În unele inframicrobioze, aspectul clinic al fazei prodromale sau al celei acute este în general suficient pentru ca medicul practician să poată preciza singur diagnosticul.

Este în special cazul rujeolei, rubeolei, varicelei, herpesului, Zonei zoster.

În aceste afecțiuni, mai ales în formele clinice clasice, caracterul eruptiv și cortegiul simptomatologic fac ca punerea diagnosticului să nu constituie o problemă.

În alte afecțiuni însă, examenul clinic poate stabili un diagnostic prezumtiv, de probabilitate și aceasta numai în anumite faze ale bolii.

Este cazul hepatitei epidemice în faza icterică, al turbării în faza acută, al poliomielitei în faza paralitică, al conjunctivitei unilaterale produse de virusul Newcastle etc.

În aceste cazuri uneori, pentru precizarea diagnosticului, este necesară asocierea datelor epidemiologice (mușcătura unui animal rabigen în antecedente, contactul cu păsări — Newcastle — etc.) cu cele furnizate de unele probe de laborator.

În alte inframicrobioze însă, datorită unei simptomatologii comune pentru mai multe afecțiuni, examenul clinic este cu totul insuficient, nepermițînd de cele mai multe ori nici măcar un diagnostic de prezumție.

Ca un exemplu cităm că un *sindrom meningian* acompaniat de un lichid cefalorahidian clar, exceptînd meningita tuberculoasă, meningita bruceloasă, poate fi produs de numeroase virusuri, printre care virusurile coriomeningitei limfocitare, virusurile poliomielitice, *Coxsackie*, ECHO, encefalitice, herpetice, urlian, zonatos etc.

Un *sindrom pneumonic* poate fi produs la rîndul său de cei mai variați inframicrobi, de virusurile gripale, Sendai, de virusurile hemadsorbante (HA), de adenovirusuri, de pararickettsii (de tipul P.A.P., ornitozei), de unele rickettsii (*Rickettsia burneti*) etc.

În aceste cazuri, pentru precizarea diagnosticului, colaborarea laboratorului este cu totul necesară.

INVESTIGAȚIILE EPIDEMIOLOGICE

Informații privind existența unor cazuri cu simptomatologie asemănătoare în teritoriul respectiv (cazuri diagnosticate sau nu), prezența unor insecte vectoare, asociate cu date referitoare la anotimp, la ocupația bolnavului, la existența în antecedente a unor injecții, a unor transfuzii, a unor manopere chirurgicale, a mușcăturilor de animale suspecte, la prezența unor rozătoare în locuință etc., constituie elemente prețioase. Ele ajută mult, prin completarea datelor clinice, la stabilirea cel puțin a unui diagnostic de prezumție.

Astfel, existența în localitate a unor cazuri cu simptomatologia gripei în lunile reci va sugera un diagnostic de gripă; evoluția în special vara și toamna a unor cazuri cu tulburări digestive, dintre care unele acompaniate de paralizii, va permite să se suspecteze poliomielita etc. Prezența flebotomilor, paralel cu evoluția unor cazuri de febră de 3—4 zile, va indica febra papataci; apariția unor simptome pulmonare, mai ales pneumonice, la indivizi ce prin ocupația lor sînt în contact cu diferite specii de păsări vii sau moarte, ne va dirija spre investigații în direcția ornitozei, iar existența la cei ce vin în contact cu păsările a unei conjunctivite intense unilaterale va sugera diagnosticul de infecție cu virusul pseudopestos aviar (Newcastle).

Apariția de fenomene encefalitice la persoane în contact cu cabaline, cu fenomene nervoase sau trăind în regiuni invadate de vectori (țînțari sau căpușe) va sugera un diagnostic diferențial în primul rînd cu diferitele encefalite virotice.

Constatarea unor fenomene meningiene la locuitorii din imobile invadate de rozătoare va pune în discuție în primul rînd coriomeningita cu virusul Armstrong; prezența de fenomene neurologice la indivizi cu mușcături mai ales de cîine, în antecedente va sugera diagnosticul de turbare. Existența în antecedente la unii icterici a unor transfuzii sau repetate tratamente parenterale ne va face să ne gîndim la o hepatită de inoculare; stabilirea în antecedentele unor bolnavi cu febră și adenopatii, a zgîrieturilor de pisică, a unor înțepături cu spini, ne va obliga să ne gîndim în primul rînd la limforeticuloza benignă de inoculare (boala ghearelor de pisică) etc.

EXAMENELE DE LABORATOR

Inițierea investigațiilor de laborator se va face totdeauna pe baza *diagnosticului de prezumție*, stabilit de examenul clinic și uneori de examenul clinic coroborat cu anchetă epidemiologică.

De la început trebuie precizat că atitudinea unor medici practicieni ce trimit produse patologice laboratorului de specialitate cu indicaţia unui diagnostic superficial de „viroză", fără nici o altă indicaţie şi cu pretenţia de a se izola un virus, este total greşită şi nu poate fi luată în consideraţie. Într-adevăr, pentru a se putea trece la stabilirea certă a unui diagnostic etiologic, inframicrobiologul necesită unele indicaţii cît mai precise din partea clinicianului sau epidemiologului, necesită un *gîndit diagnostic de prezumţie*. Întotdeauna un produs patologic trimis laboratorului (şi este necesar ca pentru fiecare inframicrobioză suspectată, clinicianul să cunoască produsul ce trebuie recoltat cu maximum de şanse pentru precizarea diagnosticului) va trebui să fie însoţit de o *fişă*, completată conştiincios. Aceasta va trebui să conţină indicaţii privind: *felul produsului*, *cîteva date asupra simptomatologiei*, *cîteva date epidemiologice şi, mai cu seamă, diagnosticul de prezumţie al medicului care trimite produsul.*

Numai după analizarea acestor date, inframicrobiologul îşi va putea stabili atitudinea, alegînd din numărul vast şi variat al probelor de laborator pe cele mai indicate.

Trebuie ştiut că diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane constă uneori în unele examene banale, în examene hematologice, alteori în probe biochimice, dar cel mai des în probe biologice specifice de izolare şi identificare a germenului, în examene serologice, în reacţii alergice, în probe microscopice de examen direct sau chiar în examene anatomopatologice. Foarte des însă inframicrobiologul este obligat să combine diferitele tipuri de metode de studiu în vederea stabilirii unui diagnostic de precizie.

Cîteva cuvinte despre fiecare din aceste metode de diagnostic şi aplicarea lor majoră:

Examene de laborator obişnuite

Examenele curente ale laboratorului clinic sînt rar folosite în vederea stabilirii unui diagnostic inframicrobiologic; cu toate acestea, în unele ocazii ele pot furniza date utile.

Astfel, *examenul hematologic*, care în mod obişnuit oferă date relative, prin evidenţierea unei leucopenii cu monocitoză, spre exemplu, la un bolnav cu fenomene gripale, poate să dirijeze diagnosticul către infecţia gripală; cu toate acestea există numeroase cazuri de gripă cu leucocitoză şi polinucleoză.

Existenţa în sîngele periferic, la un bolnav cu febră şi adenopatii, a unei hiperleucocitoze cu mononucleoză marcată, sugerează un diagnostic de prezumţie de mononucleoză infecţioasă; leucocitoza cu o intensă limfocitoză la un astfel de bolnav dirijează însă atenţia către o limfocitoză infecţioasă.

Viteza de sedimentare a hematiilor nu are nici o aplicaţie în diagnosticul virozelor. Astfel, în hepatita epidemică, unde această probă este încă apreciată de unii autori, viteza de sedimentare poate fi crescută, dar poate fi şi normală sau chiar scăzută.

Examenul lichidului cefalorahidian aduce unele date utile ce trebuie însă aproape întotdeauna completate şi coroborate cu probe biologice sau serologice. Într-adevăr, un lichid clar, hipertensiv, cu pleiocitoză, poate aparţine, atît unei coriomeningite limfocitare, cît şi unei infecţii produse de un germen din grupul enterovirusurilor, unei infecţii urliene, unui herpes etc.

Această probă constituie însă un adjuvant preţios pentru orientarea investigaţiilor inframicrobiologului.

Examene biochimice

Dintre examenele biochimice ce constituie, în general, probe de investigaţie suplimentară există unele ce au aplicare în special în diagnosticul hepatitelor epidemice inframicrobiene. De altfel, în momentul de faţă un bun diagnostic de laborator al acestei afecţiuni virotice se face aproape exclusiv cu ajutorul tehnicilor biochimice.

Într-adevăr, în afara probelor uzuale hepatice un aport considerabil pentru identificarea bolii îl aduce dozarea activităţii aldolazei sau a transaminazei serice şi în special a primei din aceste enzime. Din experienţa noastră, testul aldolazei, deşi nespecific, constituie pînă în momentul actual, cea mai fidelă reacţie de diagnostic pe care o cunoaştem, de o valoare deosebită, atît pentru precocitatea ei, cît şi pentru depistarea formelor inaparente clinic, avînd astfel şi o reală valoare epidemiologică.

Examene inframicrobiologice

Metodele specifice folosite de laboratorul de inframicrobiologie pot fi grupate, după cum am arătat mai sus, în metode de izolare a inframicrobilor specifici, în metode serologice, în metode alergice și în examene morfologice.

Metodele de izolare a germenului specific, se pot realiza pe animale de laborator sensibile, pe ouă de găină embrionate sau în culturi celulare, în funcție de inframicrobul în cauză. După izolarea virusului respectiv, de cele mai multe ori sînt necesare probe suplimentare de identificare a germenului izolat (probe biologice, serologice etc.). Pentru unii inframicrobi, identificarea poate fi efectuată rapid, iar pentru alții este necesar un timp mai mult sau mai puțin îndelungat.

Pentru izolarea agentului etiologic se folosesc diferite produse patologice în funcție de inframicrobul respectiv: *sînge* pentru oreion, encefalită, ornitoză, tifos exantematic, febra Q, leucoze etc.; *lichid cefalorahidian* pentru oreion, coriomeningită; *spălături nazo-faringiene* pentru gripă, adenoviroze; *salivă, expectorații,* pentru ornitoză; *secreție conjunctivală* pentru trahom, conjunctivită cu incluzii, Newcastle; *materii fecale* pentru poliomelită, infecțiile cu virusuri ECHO, *Coxsackie*, A.P.C., etc.; *lichid vezicular* pentru herpes, variolă, varicelă; *măduvă osoasă* pentru leucoze; *suspensii de țesuturi recoltate biopsic* (ficat, ganglion) pentru izolarea agenților etiologici ai hepatitei epidemice, ai bolii Hodgkin etc.; *emulsie de organe virulente* (creier, măduvă, glande salivare, ficat etc.) recoltate la necropsie, pentru diagnosticul de rabie, encefalită, poliomielită, hepatită etc.

Cunoașterea ierarhiei, apreciată prin conținutul în virus al diferitelor produse patologice necesare diagnosticului în fiecare viroză este un element de primă importanță, căci de foarte multe ori laboratorului i se trimit produse neadecvate și în consecință diagnosticul nu se poate stabili decît cu mari dificultăți sau chiar de loc.

Exemplul cel mai frecvent de atitudine greșită prin necunoașterea acestor amănunte îl furnizează diagnosticul unei meningite cu lichid clar, caz în care aproape niciodată clinicianul nu trimite materiile fecale, ci numai lichidul cefalorahidian și rar sînge; or, cum multe meningite virotice sînt produse de enterovirusuri (poliomielită, *Coxsackie*, ECHO) materiile fecale, prin bogăția lor în corpusculi virotici, sînt indispensabile.

Izolarea virusului pe animale sensibile. Speciile animale și căile de inoculare se aleg în funcție de diagnosticul de prezumție. Se folosesc, spre exemplu, șoareci adulți în cazul suspectării coriomeningitei limfocitare, encefalitei, turbării, iar calea de inoculare electivă este cea intracerebrală; se folosesc șoareci nou-născuți, inocularea practicîndu-se pe cale subcutanată, în cazul infecțiilor cu virusuri *Coxsackie;* se preferă iepurii și calea corneeană pentru izolarea virusului herpetic, aceeași specie animală și inocularea pe cale tegumentară, testiculară și corneeană în cazul necesității stabilirii unui diagnostic diferențial între vaccină și variolă; se utilizează cobaiul și calea intraperitoneală în infecția exantematică, aceeași specie animală și calea de inoculare intracutanată în regiunea metatarsiană pentru izolarea virusului febrei aftoase; se va alege hamsterul pentru izolarea virusului rabic etc.

Rezultatul inoculării, de cele mai multe ori boala experimentală, permite concluzii foarte utile stabilirii diagnosticului. Uneori chiar singură, simptomatologia bolii experimentale poate preciza diagnosticul; alteori însă, sînt necesare probe suplimentare.

Astfel, inocularea de produse bănuite herpetice, pe corneea scarificată a iepurelui urmată de apariția unei keratite și consecutiv a unor fenomene encefalitice, stabilește simplu diagnosticul. Examenul histopatologic al fragmentelor de encefal, cu evidențierea leziunilor caracteristice la nivelul ,,zonei elective'' a lui Levaditi și Nicolau, transformă diagnosticul într-o certitudine.

Paralizia șoarecelui nou-născut, urmată de moarte, la cîteva zile de la inocularea suspensiilor de materii fecale provenite de la un suspect de infecție cu virus *Coxsackie*, dă argumente serioase pentru diagnosticul respectiv; descoperirea miozitei microscopice transformă prezumția într-un diagnostic de certitudine pentru grupul A *Coxsackie*.

Apariția fenomenelor encefalitice, cu paralizii mai mult sau mai puțin generalizate, după inocularea intracerebrală de produse suspecte de rabie, cu prezența incluziilor caracteristice Babeș-Negri în citoplasma neuronilor, autentifică diagnosticul de turbare.

Producerea febrei caracteristice la cobai după inocularea produselor recoltate de la un suspect de tifos exantematic aduce date extrem de prețioase diagnosticului; apariția în plus a unei reacții scrotale poate să precizeze chiar tipul rickettsiei (*R. mooseri* etc.).

În același timp, însă apariția de simptome encefalitice la 4—10 zile de la inocularea intracerebrală la şoarece a unor produse provenite de la bolnavii suspecţi de encefalită constituie numai un început în stabilirea diagnosticului. Precizarea lui necesită probe serologice suplimentare (reacţii de neutralizare etc.).

Inoculările în oul de găină embrionat, introduse în practică în urma lucrărilor lui Woodruff şi Goodpasture, se folosesc pe scară largă pentru izolarea unui număr destul de mare de agenţi inframicrobieni, mai ales pentru cei din grupul mixovirusurilor, pentru unele pararickettsii şi chiar rickettsii.

Ca şi în cazul inoculărilor la animal, calea de infectare se alege după germenul suspectat: *calea amniotică* pentru gripă, oreion; *calea membranei corioalantoidiene* pentru virusuri din grupul variolo-vaccinei; *calea vitelină* pentru pararickettsii (ornitoză, limfogranulomatoză venerică, trahom) şi rickettsii etc.

În mod curent, rezultatul inoculărilor pe oul embrionat furnizează numai un diagnostic de probabilitate, căci aproape totdeauna pentru precizarea diagnosticului etiologic sînt necesare examene suplimentare.

Astfel, rezultatul inoculării virusurilor gripale sau urliene se apreciază, aproape exclusiv cu ajutorul unor probe biologice, ca reacţia, de hemaglutinare şi hemaglutinoinhibare; rezultatul inoculării germenilor pararickettsieni şi rickettsieni se stabileşte numai după un examen direct, după coloraţii specifice ale corpusculilor din amprentele de membrană etc.

Inoculările în culturi celulare. După cum s-a mai precizat, dezvoltarea deosebită pe care au luat-o tehnicile de cultivare a virusurilor în culturile celulare constituie unul din elementele ce au determinat în cel mai înalt grad, pe de o parte, lărgirea domeniului inframicrobiologiei, iar pe de altă parte, simplificarea şi extinderea diagnosticului a numeroase viroze, în special pentru cele ale căror agenţi etiologici nu au putut fi transmişi animalelor de laborator sau cultivaţi în formaţiunile embrionului de găină ca şi pentru cele ce necesitau ca animal de elecţie maimuţa, animal extrem de costisitor şi greu de procurat.

Folosită încă din 1913 de C. Levaditi, care a cultivat virusul poliomielitic *in vitro*, în ţesut ganglionar nervos simian, metoda culturilor celulare a luat o extindere deosebită o dată cu cea de-a doua jumătate a secolului al XX-lea cînd atenţia cercetătorilor a fost atrasă de posibilităţile de cultivare largă a virusurilor poliomielitice în culturi de celule neneuronale (Enders şi colab.).

Este interesant de ştiut că saltul calitativ al metodei culturilor celulare se datoreşte în primul rînd trecerii de la tehnicile greoaie, delicate, folosite numai pe scară redusă şi cu aplicaţii limitate, ca cele ce utilizau un suport de plasmă, la tehnica tripsinizării (Frish şi Jentoft), tehnică universal răspîndită şi care permite obţinerea de celule din cele mai variate organe şi ţesuturi.

Totodată, de un real folos pentru introducerea curentă în laboratorul de virusologie a culturilor de celule s-a dovedit modificarea mediilor nutritive (de creştere şi de întreţinere) în pas cu metodele de cultivare.

De la plasma şi trefoanele enigmatice de acum 50 de ani s-a ajuns la mediile sintetice, de tipul mediului 199 Morgan-Morton-Parker, sau al mediului 858 Healy etc. În acelaşi timp s-au făcut progrese şi în direcţia preparării unor medii nutritive simple şi economice, la îndemîna laboratoarelor mai puţin înzestrate sau de rutină. Astfel, adaosuri ca hidrolizatul enzimatic de lactalbumină, ca extractul de drojdie sau bulionul „peptonat'', permit prepararea unor medii cu mare valoare nutritivă, la îndemîna oricărui laborator.

De altfel, în afara culturilor primare, o mare dezvoltare cunosc astăzi în special culturile „continue''. Astfel, pe lîngă tulpina HeLa (Gey), provenită dintr-un epiteliom de col uterin şi tulpina „L'' (Earle) de fibroblaşti de şoarece, au fost obţinute noi tulpini, ca cele de celule conjunctivale hepatice, cele renale (Chang), tulpina KB (Eagle), tulpina H. C. (cord cynomolgus — Salk), tulpinile cu celule epiteliale umane denumite Hep, provenite din diverse tumori sau ţesuturi umane normale, tulpinile Detroit, tulpinile P_1.E.U. şi R_1.E.U. (Aderca), tulpinile H.L.S. (limfosarcom uman), E.R.K. (rinichi embrion iepure) etc.

Dezvoltarea deosebită a metodei a permis ca astăzi, în majoritatea laboratoarelor, culturi din cele mai variate tipuri de celule (renale de maimuţă, de porc, de viţel, celule amniotice sau embrionare umane, de iepure, şoarece etc., celule normale sau celule canceroase etc.) să înlocuiască în mare măsură animalele de laborator mai ales pentru lucrul curent de diagnostic al unor viroze, ca poliomielita, herpesul, rujeola, unele infecţii cu virusuri *Coxsackie;* ele reprezintă totodată — cum am mai arătat de altfel — unica posibilitate de izolare şi întreţinere a unor virusuri, ca cele din grupul ECHO, A.P.C., sinciţial respirator C. A., hemadsorbant etc.

Introducerea recentă a metodei clonării, avînd ca rezultat obţinerea unor linii celulare genetic pure, cu caractere stabile, a permis la rîndul ei progrese deosebite.

Eleganţa metodei culturilor celulare, valoarea sa deosebită prin eliminarea factorilor reacţionali individuali ai animalelor de experienţă, importanţa sa economică (fiecare tub de cultură înlocuind un animal de experienţă, reprezintă mai puţin decît a 10-a parte din costul animalului cel mai ieftin), justifică necesitatea generalizării metodei.

De notat că rapiditatea obţinerii de rezultate ale inoculărilor în culturile de celule este în funcţie în primul rînd de virusul în cauză; totdeauna însă răspunsul se obţine mult mai rapid decît în cazul inoculărilor la animale (48—72 de ore în loc de 10—14 zile pentru herpes, 48—96 de ore în loc de 8—14 zile pentru poliomielită etc.).

Pozitivitatea inoculărilor se apreciază pentru cea mai mare parte din virusurile astfel cultivabile, după lezarea celulelor infectate, după aşa-zisul *efect citopatic*. Dat fiind că de cele mai multe ori tipul acestui ,,efect citopatic'' este mult asemănător, după izolarea oricărui agent citopatogen este necesară tiparea lui prin neutralizări cu seruri imune de referinţă. Nu trebuie însă să se uite că există şi virusuri care cultivă fără modificări celulare evidente şi că pentru precizarea existenţei şi multiplicării lor în culturile respective trebuie folosite tehnici sau metode suplimentare, cum este, printre altele, interesantul *test de hemadsorbţie*.

În afară însă de posibilităţile de izolare a unor virusuri în culturi de celule, metoda oferă posibilităţi extraordinare pentru studii vaste epidemiologice privind, spre exemplu, incidenţa anticorpilor faţă de poliomielită într-o populaţie determinată. Într-adevăr, cu această metodă se pot simplu cerceta anticorpii faţă de diferite tipuri antigenice de virus poliomielitic în serul a mii de persoane, operaţie practic imposibilă în trecut, numai dacă considerăm, spre exemplu că fiecare tub de cultură celulară trebuia să fi fost înlocuit de o maimuţă.

Nu trebuie, de asemenea, să se uite că cea mai mare parte din numeroasele virusuri descoperite în ultimii ani au fost izolate şi cunoscute graţie culturilor de celule. Este un argument în plus care să justifice necesitatea răspîndirii cît mai largi a acestei metode.

Metodele serologice, abandonate în trecut în diagnosticul majorităţii inframicrobiozelor umane au ajuns ca astăzi — datorită în special perfecţionării tehnicilor de preparare a antigenelor — să fie considerate dintre cele mai utile în diagnosticul curent. Ele au în laborator o aplicare dublă: identifică un virus izolat şi pun în evidenţă anticorpii din serul bolnavilor. În acest din urmă caz, studiul dinamic are un rol cu totul deosebit.

Dintre numeroasele reacţii serologice propuse (*reacţia de aglutinare, reacţia de precipitare, reacţia de aglutinare la rece, reacţia de fixare a complementului, reacţia de neutralizare, reacţia de hemaglutinare şi hemaglutinoinhibare, reacţia Weil-Felix, reacţia de conglutinare, reacţia Paul Bunnell-Hănganuţiu* etc.), în practica uzuală se folosesc cel mai des reacţia de neutralizare, reacţia de hemaglutinare şi hemaglutinoinhibare (pentru virusurile hemaglutinante), reacţia de fixare a complementului şi reacţia de microaglutinare (pentru pararickettsii şi rickettsii). Alegerea uneia sau alteia din aceste reacţii se face în funcţie de scopul urmărit (identificarea unui virus, diagnostic), de inframicrobul în cauză, de stadiul bolii etc.

Reacţia de neutralizare (R. N.) este cel mai larg întrebuinţată în vederea identificării unui inframicrob izolat şi — avînd caracterul unei reacţii de tip — chiar a tipului serologic, dar şi pentru diagnosticul propriu-zis al unor viroze, mai ales a unui diagnostic într-un stadiu mai avansat al bolii sau chiar retrospectiv; aceasta deoarece anticorpii neutralizanţi care, comparativ cu alţi anticorpi apar mai tîrziu (după a 15-a zi), persistă cîţiva ani. Este reacţia cel mai des folosită în anchetele epidemiologice privind incidenţa anticorpilor în populaţie. Deşi valabilă pentru toţi inframicrobii, reacţia are aplicaţii majore în entero- şi neuroviroze. O dată cu avîntul luat de culturile celulare, pentru izolarea şi cultivarea a numeroşi inframicrobi, importanţa reacţiei de neutralizare a devenit cu totul evidentă. Într-adevăr, ea este indispensabilă identificării unui virus izolat în culturile de celule, mai ales datorită faptului că efectul citopatic — după cum am mai semnalat — este asemănător pentru majoritatea virusurilor astfel cultivabile.

Reacţiile de hemaglutinare şi hemaglutinoinhibare (R.H.A. şi

R.H.A.I.), comode și la îndemîna tuturor laboratoarelor, au un rol cu totul deosebit în diagnosticul unor afecțiuni produse de inframicrobi ce au calitatea de a aglutina hematiile diferitelor specii animale (virusul gripal, urlian, hepatitic sclerogen și Botkin, vaccinal, anumite tipuri ale virusurilor ECHO, Newcastle, encefalitic etc.). Dacă reacția în faza ei de hemaglutinare ajută la stabilirea prezenței unui agent hemaglutinant, partea a doua a reacției, hemaglutinoinhibarea, are un rol asemănător cu al reacției de neutralizare, identificînd virusul izolat.

În practică, reacția este folosită foarte mult pentru diagnosticul gripei (de altfel viroza în care fenomenul hemaglutinării a fost pentru prima dată descoperit de către G. Hirst), prin precizarea prezenței virusului în faza incipientă și acută a bolii în spălăturile nazo-faringiene, prin punerea în evidență a cultivării lui în oul embrionat, ca și pentru identificarea în serul bolnavilor a anticorpilor inhibanți antigripali de tip, care studiați dinamic, reprezintă un element deosebit pentru diagnostic. Totodată, reacția are și o valoare importantă epidemiologică, precizînd incidența anticorpilor de tip în populație, jucînd deci un rol decisiv și în indicarea tipurilor de virus necesare preparării vaccinurilor.

În afara diagnosticului infecțiilor cu mixovirusuri, reacția a căpătat o mare utilizare în ultima vreme pentru identificarea encefalitelor virotice. S-a simplificat astfel una din problemele dificile ale laboratorului de virusologie.

Recent, în afara R.H.A. și R.H.A.I. directe, a început să fie mult folosită metoda aglutinării, zisă indirectă, a hematiilor de om, pui de găină sau de *Macacus Rhesus*, sub acțiunea serurilor bolnavilor de hepatită epidemică. Deși metoda nu este specifică, rezultatele obținute reușesc să contribuie în oarecare măsură la stabilirea diagnosticului.

Reacția de fixare a complementului (R.F.C.) care ca principiu în inframicrobioze nu diferă de cea din bacterioze, cunoaște o serie de complicații în privința preparării antigenelor și tehnicilor de execuție. Ea se efectuează de cele mai multe ori — datorită greutăților de preparare a antigenelor și în consecință și a costului lor ridicat — prin tehnica microreacțiilor în tuburi și mai ales pe plăci, iar datorită cantității mici de anticorpi existenți în unele seruri și prin tehnicile zise *indirecte* (inhibarea parțială a antigenului cu seruri standard). În același timp trebuie cunoscut că unele antigene, neputînd fi inactivate, pot prezenta unele riscuri de contaminare în decursul manipulării lor. Cu toate acestea, reacția are aplicații majore în unele inframicrobioze, cum ar fi oreionul, gripa, encefalitele, adenovirozele, dar mai ales în unele din cele produse de germeni mari din grupul pararickettsiilor (limfogranulomatoza venerică, ornitoza) și rickettsiilor (tifos exantematic, tifos pulmonar — febra Q etc.). De remarcat că, titrul reacțiilor efectuate cu antigene rickettsiene și pararickettsiene ating valori mari în opoziție cu cele scăzute obținute în reacțiile cu antigene virotice. Avantajul RFC constă în faptul că dintre probele serologice este cea mai precoce pozitivă (începînd cu a 4-a — a 5-a zi de boală).

Datorită faptului că — spre deosebire de anticorpii neutralizanți — anticorpii fixatori de complement persistă foarte puțin (în medie 2—3 luni), reacția are un rol mai mare ca seroneutralizarea în diagnosticul direct, neavînd însă valoare pentru diagnosticul retrospectiv și nici pentru anchete epidemiologice. Este necesar, de asemenea, de știut că spre deosebire de reacția de seroneutralizare, care este o reacție de tip, RFC este de obicei o reacție de grup.

O precizare cu totul necesară, valabilă de altfel pentru aproape toate reacțiile serologice folosite în inframicrobioze: *obligativitatea efectuării studiului anticorpilor în dinamică* pe 2—3 probe de ser, recoltate la interval de 7—10 zile fiecare.

Reacția de aglutinare a corpusculilor elementari, în trecut puțin folosită și exclusiv pentru identificarea unor inframicrobi de talie mare, a căpătat în ultima vreme un interes deosebit, datorită introducerii în practică a unei modificări de tehnică, care au transformat-o într-o reacție comodă de microaglutinare. Perfecționat de P. Giroud și colab. *testul de microaglutinare* (testul Giroud) aplicat în diagnosticul infecțiilor pararickettsiene și rickettsiene, cunoaște astăzi o utilizare largă o dată cu precizarea marei răspîndiri în natură a acestor germeni și a relațiilor etiologice cu un extrem de mare număr de afecțiuni de cea mai mare importanță (angiopatii, malformații congenitale, boala ulceroasă etc.).

În afara acestor reacții de rutină, o utilizare mai limitată au cele de aglutinare la rece (în pneumonia atipică primară), de floculare (în poliomelită), reacția Paul-Bunnell-Hăngănuțiu-Davidsohn (în mononucleoza infecţioasă), reacţia Weil-Felix (în tifosul exantematic) etc.

În ultima vreme, specialiştii îşi pun mari speranţe în metoda *anticorpilor fluorescenţi*, metodă ce se bazează pe vizualizarea în lumină ultravioletă a cuplării antigenului cu anticorpii marcaţi cu substanţe fluorescente (Coons, 1942).

Indiferent de tehnica folosită (directă sau indirectă), metoda şi-a arătat valoarea, printre altele, pentru detectarea şi localizarea corpusculilor virotici în celulele diferitelor ţesuturi şi organe, dovedindu-se în consecinţă foarte utilă diagnosticului de laborator al unor viroze. Pînă în prezent, rezultate promiţătoare au fost obţinute în turbare, gripă, encefalită, adenoviroze etc.

Metodele alergice sînt folosite — în opoziţie cu celelalte metode descrise — pe o scară mult mai redusă în diagnosticul unor inframicrobioze. Dintre acestea trebuie totuşi semnalate *intradermoreacţia Frey* ca şi *hemoreacţia* (introducerea antigenului Frey pe cale intravenoasă) din limfogranulomatoza venerică, *intradermoreacţia Debré* folosită în limforeticuloza benignă de inoculare (boala ghearelor de pisică), intradermoreacţia din ornitoză, cea din oreion practicată cu ovoantigene sau cu lichid cefalorahidian, ca şi reacţia încercată în hepatita epidemică cu un ovoantigen sau cu sucul gastric al bolnavului. Dacă pentru diagnostic reacţiile alergice din unele pararickettsioze (limfogranulomatoza venerică, ornitoza, boala ghearelor de pisică) au aplicabilitate, întrebuinţarea acestui tip de reacţie în oreion şi mai puţin chiar în hepatitele epidemice este pînă în momentul de faţă foarte limitată.

Este cazul să amintim aici şi *reacţiile anafilactice* propuse de L. A. Zilber în decelarea antigenelor tumorale şi aplicate recent în Institutul de inframicrobiologie al Academiei R.P.R. şi pentru decelarea virusului hepatitei epidemice. Este vorba de *sensibilizarea* cobailor cu un extract de ţesut patologic (spre exemplu o tumoare hepatică sau fragmente de ficat prelevate de la morţi cu hepatită epidemică), de *desensibilizare* cu extract de organ normal (ficat) şi de *declanşarea şocului anafilactic* cu produsul patologic conţinător al virusului (virusul tumoral, virusul hepatitic etc.). Reacţia anafilactică nu a intrat însă pînă la ora actuală în rutină.

Metodele morfologice. Folosite în diagnosticul inframicrobiozelor umane, ele constau mai puţin în examenul microscopic direct (efectuat în vederea decelării unor corpusculi inframicrobieni de talie mare şi în special al celor pararickettsieni şi rickettsieni), dar mai ales pentru decelarea incluziilor caracteristice în unele produse patologice (secreţii uretrale, conjunctivale, biopuncţii hepatice etc.), în materialul necropsic uman sau al animalelor de experienţă (turbare, vaccină, hepatită Botkin etc).

Examenul microscopic direct se face mai ales pe frotiuri colorate după metode diverse (Nicolau, Machiavello, Castaneda, Giemsa etc.), obişnuit — aşa cum s-a arătat — pentru evidenţierea unor pararickettsii sau rickettsii (trahom, ornitoză, limfogranulomatoză venerică). Există cazuri cînd şi *examenul morfologic electronooptic* al unor virusuri poate, la rîndul lui, folosi diagnosticului. Este cazul în special al diagnosticului diferenţial de urgenţă, care trebuie efectuat între un virus variolic, vaccinal sau varicelos, cînd de rapiditatea diagnosticului depinde luarea de măsuri juste de profilaxie în masă.

Cît priveşte examenul morfopatologic propriu-zis, el se rezumă, fie la decelarea incluziilor caracteristice, fie la completarea diagnosticului unei boli experimentale.

Astfel, decelarea incluziilor are un rol cu totul deosebit în precizarea diagnosticului de turbare, mai ales la animalul muşcător, la care descoperirea incluziilor Babeş-Negri stabileşte neîndoios diagnosticul. Cercetarea acestora se face de obicei pe secţiuni de creier (corn Ammon) colorate cu metode speciale (Mann, Lenz), sau pe secţiuni necolorate şi examinate rapid cu microscopul de contrast de fază. Evidenţierea rapidă a incluziilor rabice se poate face şi pe frotiurile colorate cu metoda Sellers, dar metoda frotiurilor poate duce la unele confuzii, mai ales cînd examenul se face la ciini cu jigodie.

În afara turbării, decelarea incluziilor în scop diagnostic se mai practică în hepatita Botkin, unde incluziile nucleare Nicolau pot fi evidenţiate în secţiunile materialului obţinut prin biopuncţii hepatice, în febra galbenă, în conjunctivita cu incluzii etc.

O importantă aplicare practică are căutarea incluziilor caracteristice în frotiurile de secreţie uretrală la cazurile cu blenoragie granuloasă cu incluzii şi, indiscutabil, pentru confirmarea diagnosticului, după inoculări experimentale, la animalele de laborator, de virusuri incluziogene (vaccină, rabie, herpes, hepatită Botkin etc.), în ouăle embrionate sau în culturi celulare (herpes, vaccină, adenoviroze etc.).

Totodată, descoperirea unor leziuni caracteristice — altele decît incluziile — permite, la rîndul ei, confirmarea diagnosticului bolii experimentale. Este cazul coriomeningitei la șoarece, al infecției cu virusuri *Coxsackie* la șoarecele nou-născut, la care decelarea miozitei, spre exemplu, are un rol primordial; este cazul herpesului la iepure, unde modificările de la nivelul zonei elective Levaditi — Nicolau autentifică diagnosticul, al poliomielitei cu virus II la șoarece etc.

Studiul caracterului efectului citopatic pe preparate colorate poate aduce, la rîndul său elemente foarte utile diagnosticului, mai ales în adenoviroze, rujeolă etc. Introducerea, alături de tehnicile cunoscute ale lui Barski, a metodei înglobării culturilor de celule, transformate sub acțiunea virusurilor, în colodiu și colorării ulterioare, a crescut în mod evident valoarea practică a examenului efectului citopatic pe preparate fixate și colorate.

★

Din datele generale expuse se poate vedea că, astăzi există numeroase metode pentru recunoașterea unui mare număr de inframicrobioze umane. Deși ele aparțin cu precădere laboratorului, inframicrobiologul singur nu le poate valorifica decît în colaborare cu medicul clinician și medicul epidemiolog. În consecință, pentru precizarea diagnosticului, este necesar pe de o parte, ca clinicianul să știe *ce poate*, *ce trebuie* și *cum trebuie* să ceară colaborarea inframicrobiologului, iar acesta din urmă trebuie — printr-o analiză judicioasă a datelor furnizate de epidemiolog și practician — să dirijeze în modul cel mai just, bineînțeles în funcție de posibilitățile locale, experimentația sa.

De rapiditatea răspunsului laboratorului de specialitate depinde în mare măsură, stabilirea celor mai juste măsuri curative, dar mai ales preventive, mai cu seamă pentru bolile cu mare extindere în masă, cum sînt foarte multe dintre inframicrobiozele umane.

Existența actualmente a unor utile metode de diagnostic etiologic al inframicrobiozelor umane și care în mare parte pot fi urgent trecute în practica uzuală obligă la înființarea și dotarea unui număr cît mai mare de laboratoare de virusologie cu materiale și cadre de specialitate. Se va ajunge astfel la o inframicrobiologie practică care, alături de latura ei de mare importanță teoretică, va reuși să autentifice din plin valoarea și necesitatea științei ce se ocupă de agenții etiologici a peste 70% din bolile infecțioase.

★

Pentru o mai bună orientare, reproducem un tabel în care sînt înșirate, în ordine alfabetică, cele mai importante dintre inframicrobiozele umane, cu indicația celor mai recomandate probe de diagnostic specific — în funcție de stadiul bolii — produsul patologic, gazdele sensibile etc. (tabelul 151)

BIBLIOGRAFIE

ADERCA I., IANCONESCU M. — Culturi de celule în inframicrobiologie, Ed. Acad. R.P.R., București, 1962.

BALȘ M. — *Microbiologia (București)*, 1961, nr. 5, p. 455.

CAJAL N. — Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane, Ed. Acad. R.P.R., București, 1958.

CAJAL N. — Progrese recente în inframicrobiologie, *Microbiologia (București)*, 1959, vol. IV, nr. 4, p. 293.

CAJAL N., DANIELESCU G., ANDREESCU M. — *Vop. Virusol.*, 1960, nr. 6, p. 691.

GIROUD P., LE GAC P. — *Med. Hyg.*, 1959, vol. 17, p. 562.

GORBUNOVA A. S., SOKOLOV M. I. — Rukovostvo po laboratnoi diagnostika grippa, paragrippoznih i adenovirusnih zabolevanii, Medghiz, Moscova, 1960.

NICOLAU S. — Elemente de inframicrobiologie generală, Ed. Acad. R.P.R., București, 1956.

NICOLAU S. și colab. — Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962.

PENSO G., BALDUCI D. — Le colture dei tessuti nella ricerca biologica, Ed. Il Pensiero Scientifica, Roma, 1962.

PORTOCALĂ R., IONESCU N. — Microscopia electronică în biologie și inframicrobiologie, Ed. Acad. R.P.R., București, 1962.

SCHMIDT N. G., LENNETTE E. H. — Recent Advances in the serodiagnosis of virus infections, *Progress in Medical Virology*, 1961, vol. 3, p. 1.

SUBLADZE A. K., GAIDAMOVICI S. I. — Kratkii curs prakticenskoi virusologhii, Medghiz, Moscova, 1954.

ZILBER L. A. — Bazele imunologiei, Ed. medicală, București, 1959.

• • • Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases, Ed. Amer. Publ. Health Ass., New York, 1956.

TABELUL 151

Probele de laborator recomandate pentru diagnosticul celor mai importante inframicrobioze umane

Inframicrobioza (în ordine alfabetică)	Stadiul bolii	Probe de laborator recomandate (în ordinea importanţei)	Produse necesare	Gazda sensibilă (în ordinea preferinţei)	Probe de laborator suplimentare pentru diagnosticul diferenţial	Probe de laborator recomandate pentru identificarea germenului izolat pe gazde sensibile	OBSERVAŢII
1	2	3	4	5	6	7	8
A.P.C. (afecţiuni respiratorii produse de adenovirusuri)	Debut	Izolarea virusului	Salivă, secreţii nazofaringiene Secreţie conjunctivală Materii fecale	Culturi celulare KB (HeLa, embrion uman etc.)	Reacţia de aglutinare la rece (negativă)	Reacţia de seroneutralizare specifică de tip Reacţia de fixare a complementului	
	Stare	Izolarea virusului Reacţia de fixare a complementului					
	Convalescenţă	Reacţia de fixare a omplementului	Sînge venos				
Conjunctivită cu incluzii	Debut	Examenul histologic	Secreţie conjunctivală Epiteliu conjunctival	Culturi de celule (preferabil HeLa)	Examenul biopsic de foliculi conjunctivali Reacţia Weil-Felix	Reacţia de seroneutralizare cu seruri standard Reacţia de fixare a complementului	
	Stare	Idem	Idem				
	Convalescenţă	Reacţia de fixare a complementului	Sînge venos				
Coxsackie	Debut	Izolarea inframicrobului	Materii fecale	Şoarecele pui Culturi de celule (rinichi de maimuţă, HeLa)	Inocularea corneeană la iepure Examenul histologic al secţiunilor de sistem nervos central şi muşchi ai şoarecilor pui	Reacţia de seroneutralizare cu seruri imune standard	Cultivarea în culturi celulare este posibilă numai pentru unele tipuri
	Stare	*a*) Izolarea inframicrobului *b*) Reacţia de fixare a complementului	*a*) Idem *b*) Sînge venos				
	Convalescenţă	Reacţia de fixare a complementului	Sînge venos				
ECHO	Debut	Izolarea virusului	Materii fecale Secreţii din nazofaringe Lichid cefalorahidian	Culturi celulare (rinichi de maimuţă, embrion uman etc.)	Inoculări la şoarece (negative)	Reacţia de seroneutralizare (specifică de tip)	
	Stare	Izolarea virusului	Idem				
	Convalescenţă	Reacţia de seroneutralizare	Sînge venos				

TABELUL 151 (continuare)

Inframicrobiora (în ordine alfabetică)	Stadiul bolii	Probe de laborator recomandate (în ordinea importanței)	Produse necesare	Gazda sensibilă (în ordinea preferinței)	Probe de laborator suplimentare pentru diagnosticul diferențial	Probe de laborator recomandate pentru identificarea germenului izolat pe gazde sensibile	OBSERVAȚII
1	2	3	4	5	6	7	8
Encefalite primitive	Debut	Izolarea virusului	Sînge venos	Șoarece	Studiul dinamic al anticorpilor serici	Reacția de seroneutralizare Reacția de fixare a complementului	
	Stare	Reacția de fixare a complementului Reacția de hemaglutinoinhibare	Idem				
	Convalescență	Reacția de seroneutralizare Reacția de fixare a complementului Reacția de hemaglutinoinhibare	Idem				
Gripă	Debut	Reacția de hemaglutinare Izolarea virusului	Secreții nazofaringiene	Embrion găină Dihor Șoarece	Citorinodiagnosticul	Reacția de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare	La sugari se va încerca și punerea în evidență a incluziilor citoplasmice în celulele epiteliului faringian
	Stare	Izolarea virusului Reacția de fixare a complementului Reacția de hemaglutinoinhibare	Secreții nazofaringiene Sînge venos				
	Convalescență	Reacția de fixare a complementului Reacția de hemaglutinoinhibare	Sînge venos				
Hepatită epidemică	Debut	Dozarea aldolazei serice Dozarea transaminazei serice	Sînge venos				În epidemiile cu virus Botkin sau sclerogen se va putea folosi reacția de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare; în cazuri necroptice triada INK Nicolau (incluzii nucleare, nucleoli monstruoși, kariokineze multiple) va putea preciza diagnosticul hepatitei Botkin
	Stare	Idem	Idem				
	Convalescență	Probele hepatice	Idem				

TABELUL 151 (continuare)

Inframicrobioza (în ordine alfabetică)	Stadiul bolii	Probe de laborator recomandate (în ordinea importanței)	Produse necesare	Gazda sensibilă (în ordinea preferinței)	Probe de laborator suplimentare pentru diagnosticul diferențial	Probe de laborator recomandate pentru identificarea germenului izolat pe gazde sensibile	OBSERVAȚII
1	2	3	4	5	6	7	8
Herpes	Debut	Izolarea virusului	Lichid vezicular	Culturi de celule embrionare umane Iepure Șoarece pui	Inocularea la animale în prealabil imunizate	Inocularea corneană la iepure Decelarea incluziilor caracteristice Reacția de neutralizare cu seruri standard pe culturi celulare sau animale	
	Stare	Idem	Idem				
	Convalescență	Reacția de fixare a complementului	Sînge venos				
Keratoconjunctivită epidemică	Debut	Izolarea virusului Examenul microscopic	Secreție conjunctivală	Culturi de celule (HeLa etc.) Șoarece pui Șoarece adult Maimuță Embrion găină		Reacția de seroneutralizare cu seruri imune Studiul histopatologic al encefalului șoarecelui Reacția de fixare a complementului	
	Stare	Examenul microscopic Reacția de seroneutralizare	Idem Sînge venos				
	Convalescență	Reacția de seroneutralizare	Idem				
Limfocitoză infecțioasă	Debut	Examenul hematologic Reacția de hemaglutinare	Sînge periferic Materii fecale		Reacția Hăngănuțiu-Paul-Bunnell (negativă)		
	Stare	Idem	Idem				
	Convalescență	Reacția de hemaglutinoinhibare	Sînge venos				
Limfogranulomatoză venerică	Debut	Izolarea inframicrobului	Puroi ganglionar	Embrion găină Șoarece Maimuță	Studiul histopatologic al fragmentelor de ganglion prelevat bioptic: decelarea pseudocelulelor gigante, a corpilor Gamna-Favre și a corpusculilor Myiagawa	Examenul virusoscopic Reacția de seroneutralizare a puterii patogene și a factorului toxic	
	Stare	*a*) Izolarea inframicrobului *b*) Reacția de fixare a complementului *c*) Reacția de seroneutralizare *d*) Reacția Frey	*a*) Puroi ganglionar *b*) } Sînge *c*) } venos				
	Convalescență	Reacția Frey					

TABELUL 151 (continuare)

Inframicrobioza (în ordine alfabetică)	Stadiul bolii	Probe de laborator recomandate (în ordinea importanței)	Produse necesare	Gazda sensibilă (în ordinea preferinței)	Probe de laborator suplimentare pentru diagnosticul diferențial	Probe de laborator recomandate pentru identificarea germenului izolat pe gazde sensibile	OBSERVAȚII
1	2	3	4	5	6	7	8
Limforeticuloză benignă de inoculare (boala ghearelor de pisică)	Debut	Intradermoreacția Debré			Puncția ganglionară		
	Stare	Idem Reacția de fixare a complementului	Sînge venos				
	Convalescență	Idem Reacția de fixare a complementului	Sînge venos				
Meningite limfocitare benigne	Debut	Examenul lichidului cefalorahidian Izolarea virusului	Lichid cefalorahidian Sînge venos	Șoarecele Cobaiul	Studiul dinamic al anticorpilor serici	Reacția de seroneutralizare cu seruri standard	Dată fiind extinderea acestei viroze printre șoareci este necesară o atenție deosebită în experimentare
	Stare	Izolarea virusului Reacția de fixare a complementului	Lichid cefalorahidian Sînge venos				
	Convalescență	Reacția de fixare a complementului Reacția de seroneutralizare	Sînge venos				
Mononucleoza infecțioasă	Debut	Examenul hematologic Reacția Hăngănuțiu-Paul-Bunnell	Sînge venos	Maimuța (inconstant)	Adenograma Testul cutanat Reacția de aglutinare comparativă pe hematii de berbec și de iepure		În interpretarea rezultatelor reacției H.P.B. va trebui să se țină seama de existența în antecedentele apropiate a injecțiilor de proteine heterologe
	Stare	Idem	Idem				
	Convalescență	Reacția Hăngănuțiu-Paul-Bunnell	Idem				
Newcastle (conjunctivită)	Debut	Izolarea virusului	Secreție conjunctivală	Oul de găină embrionat		Reacția de hemaglutinoinhibare Reacția de seroneutralizare	
	Stare	Idem	Idem				
	Convalescență	Reacția de hemaglutinoinhibare Reacția de fixare a complementului Reacția de seroneutralizare	Sînge venos				

TABELUL 151 (continuare)

Inframicrobioza (in ordine alfabetică)	Stadiul bolii	Probe de laborator recomandate (in ordinea importanței)	Produse necesare	Gazda sensibilă (in ordinea preferinței)	Probe de laborator suplimentare pentru diagnosticul diferențial	Probe de laborator recomandate pentru identificarea germenului izolat pe gazde sensibile	OBSERVAȚII
1	2	3	4	5	6	7	8
Oreionul	Debut	Izolarea virusului	Salivă Singe venos Lichid cefalorahidian	Embrion de găină Maimuța	Testul cutanat	Reacția de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare Inocularea in camera anterioară a ochiului de cobai	
	Stare	Idem Reacția de fixare a complementului	Idem				
	Convalescență	Reacția de fixare a complementului Reacția de hemaglutinoinhibare Testul cutanat	Singe venos				
Ornitoză	Debut	Izolarea inframicrobului	Singe venos Expectorații	Embrion de găină Șoarece	Reacția Frey	Examen morfologic Reacția de seroneutralizare a puterii patogene și a factorului toxic Reacția de fixare a complementului	Se recomandă precauții suplimentare in cursul experimentării pentru prevenirea infecțiilor accidentale
	Stare	Izolarea inframicrobului Reacția de fixare a complementului Intradermoreacția	Idem				
	Convalescență	Reacția de fixare a complementului Reacția de aglutinare a corpusculilor elementari	Singe venos				
Pneumonie atipică primară	Debut	Aglutinarea streptococului M.G.	Singe venos		Reacția Weil-Felix Reacția de fixare a complementului cu antigen ornitozic		
	Stare	Reacția de aglutinare la rece	Singe venos, ser, plasmă				
	Convalescență	Reacția de aglutinare la rece	Idem				
Poliomielită	Debut	Izolarea virusului Reacția de fixare a complementului Testul de floculare	Materii fecale Singe venos	Culturi celulare Maimuță Șoarece (pentru tipul II)	Studiul dinamic al anticorpilor serici Inocularea la șoarecele pui	Reacția de neutralizare cu seruri imune standard	În cazuri mortale se vor preleva steril fragmente de creier și măduvă pentru inoculări și examen histopatologic
	Stare	Izolarea virusului Testul de floculare	Materii fecale Singe venos				
	Convalescență	Reacția de fixare a complementului	Singe venos				

TABELUL 151 (continuare)

Inframicrobioza (în ordine alfabetică)	Stadiul bolii	Probe de laborator recomandate (în ordinea importanței)	Produse necesare	Gazda sensibilă (în ordinea preferinței)	Probe de laborator suplimentare pentru diagnosticul diferențial	Probe de laborator recomandate pentru identificarea germenului izolat pe gazde sensibile	OBSERVAȚII
1	2	3	4	5	6	7	8
Rubeolă	Debut	Examenul hematologic Izolarea virusului	Sînge venos	Culturi celulare Iepurele		Reacția de seroneutralizare	
	Stare	Examenul hematologic	Idem				
	Convalescență	Idem	Idem				
Rujeolă	Debut	Examenul hematologic Izolarea virusului	Sînge venos Secreții din nazofaringe Urină	Culturi celulare (amnios uman) Cățel nou născuți		Reacția de seroneutralizare	În cazuri letale sau la prelevări chirurgicale fortuite în faza precoce se va urmări decelarea pseudocelulelor gigante în organele limfatice
	Stare	Examenul hematologic	Sînge venos				
	Convalescență	Reacția de seroneutralizare	Idem				
Tifos exantematic	Debut	Izolarea inframicrobului Reacția de fixare a complementului	Sînge venos	Cobai Embrion de găină	Reacția de precipitare Studiul dinamic al anticorpilor fixatori de complement	Examenul morfologic Reacția de aglutinare a corpusculilor elementari Reacția de fixare a complementului	
	Stare	Reacția de aglutinare a corpusculilor elementari Reacția Weil-Felix Reacția de fixare a complementului	Idem				
	Convalescență	Reacția de aglutinare a corpusculilor elementari	Idem				
Tifos pulmonar (febră „Q")	Debut	Izolarea germenului	Sînge venos	Cobai Embrion de găină	Studiul dinamic al anticorpilor fixatori de complement Reacția Weil-Felix (negativă)	Reacția de fixare a complementului Reacția de aglutinare a rickettsiilor	
	Stare	Izolarea germenului Reacția de fixare a complementului	Idem				
	Convalescență	Reacția de fixare a complementului					

TABELUL 151 (continuare)

Inframicrobioza (în ordine alfabetică)	Stadiul bolii	Probe de laborator recomandate (în ordinea importanței)	Produse necesare	Gazda sensibilă (în ordinea preferinței)	Probe de laborator suplimentare pentru diagnosticul diferențial	Probe de laborator recomandate pentru identificarea germenului izolat pe gazde sensibile	OBSERVAȚII
1	2	3	4	5	6	7	8
Trahom	Debut	Examenul histologic Izolarea germenului	Secreție conjunctivală și epiteliu conjunctival	Embrion de găină Șoarece pui (neconfirmat)	Examenul biopsic al foliculilor conjunctivali	Reacția de neutralizare cu seruri standard Reacția de aglutinare a hematiilor de șoarece	
	Stare	a) Examenul histologic b) Reacția Weil-Felix Reacția de fixare a complementului	a) Idem b) Sînge venos				
	Convalescență	Reacția de fixare a complementului	Sînge venos				
Turbare	Debut	Izolarea virusului Depistarea incluziilor caracteristice (corpii Babeș-Negri)	Fragmente de encefal, corn Ammon, scoarță, bulb	Hamster Șoarece Cobai Iepure		Examenul histopatologic Reacția de neutralizare cu ser imun standard Probele de inoculare la animale imunizate	
	Stare	Idem	Idem				
Uretrită cu incluzii	Debut	Decelarea incluziilor caracteristice	Secreția uretrală		Examen microscopic al produsului de raclaj conjunctival		
	Stare	Idem	Idem				
Vaccină	Debut	Inocularea experimentală Examenul virusoscopic	Produse recoltate de la nivelul leziunilor tegumentare	Culturi celulare Iepure (cornee) Maimuță Embrionul de găină	Decelarea incluziilor citoplasmice caracteristice	Inocularea la animale sensibile Proba Paul Reacția de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare Reacția de seroneutralizare cu ser standard Testul de hemadsorbție Tehnica anticorpilor fluorescenți	La interpretarea rezultatelor reacțiilor serologice se va ține seama de antecedentele vaccinale
	Stare	Idem	Idem				
	Convalescență	Reacția de hemaglutinoinhibare Reacția de aglutinare a corpusculilor elementari Reacția de fixare a complementului	Sînge venos				

TABELUL 151 (continuare)

Inframicrobioza (în ordine alfabetică)	Stadiul bolii	Probe de laborator recomandate (în ordinea importanței)	Produse necesare	Gazda sensibilă (în ordinea preferinței)	Probe de laborator suplimentare pentru diagnosticul diferențial	Probe de laborator recomandate pentru identificarea germenului izolat pe gazde sensibile	OBSERVAȚII
1	2	3	4	5	6	7	8
Varicelă	Debut	Inocularea experimentală	Produse recoltate de la nivelul leziunilor tegumentare	Culturi celulare Maimuță	Inocularea negativă la iepure Decelarea incluziilor nucleare caracteristice	Reacția de fixare a complementului Reacția de seroneutralizare Reacția de aglutinare a corpusculilor elementari	
	Stare	Inocularea experimentală Examenul virusoscopic	Idem				
	Convalescență	Reacția de fixare a complementului	Sînge venos				
Variolă	Debut	Inocularea experimentală Metoda anticorpilor fluorescenți	Sînge venos Spălături nazofaringiene	Maimuță Iepure Culturi celulare Ou embrionat	Decelarea incluziilor nucleare și citoplasmice caracteristice Examenul morfologic electronooptic	Inocularea simultană la iepure și maimuță Proba Paul Examenul histopatologic Examenul morfologic electronooptic Testul de hemadsorbție Tehnica anticorpilor fluorescenți	La interpretarea rezultatelor reacțiilor serologice se va ține seama de antecedentele vaccinale
	Stare	Inocularea experimentală Examenul virusoscopic Metoda anticorpilor fluorescenți	Sînge venos Lichid vezicular Spălături nazofaringiene				
	Convalescență	Reacția de fixare a complementului Reacția de aglutinare a corpusculilor elementari	Sînge venos				
Zona zoster	Debut	Examenul virusoscopic Izolarea virusului	Lichid vezicular	Culturi celulare Culturi mixte (ou-țesut)	Inocularea negativă la animale de laborator	Decelarea incluziilor caracteristice Reacția de neutralizare	
	Stare	Idem	Idem				
	Convalescență	Reacția de neutralizare	Sînge venos				

TEHNICI MAI FRECVENT FOLOSITE ÎN DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFRAMICROBIOZELOR

RECOLTAREA MATERIALULUI INFECŢIOS

Una din condiţiile esenţiale pentru stabilirea unui corect diagnostic de laborator al afecţiunilor inframicrobiene constă în recoltarea şi transportul la laboratorul de specialitate, în condiţii optime, al celor mai adecvate produse patologice.

Faptul că nu pentru toate virozele trebuie recoltate aceleaşi materiale, că pentru unele din ele produsul cel mai bogat în virus poate apărea ca un paradox (spre exemplu, folosirea cu prioritate a materiilor fecale pentru diagnosticul unei meningite virotice), că deseori încercările de izolare şi identificare a germenului specific trebuie dublate de examene serologice etc. obligă, aşa cum s-a mai subliniat, ca cel ce cere diagnosticul să cunoască, în afară de produsele patologice cele mai indicate, şi ierarhia probelor de laborator pe care urmează să le pretindă şi tehnicile cele mai corecte de recoltare şi transport al acestor produse. Din aceste motive considerăm necesar a da unele indicaţii în această privinţă şi, în primul rînd, cîteva consideraţii generale.

Astfel, pentru izolarea inframicrobului specific, indiferent de materialul infecţios folosit, se va prefera recoltarea cît mai aproape de debutul bolii.

Recoltarea se va face în cele mai stricte condiţii de sterilitate bacteriologică.

Dacă inocularea nu se poate efectua imediat după recoltare, produsul va fi menţinut la temperaturi joase (+4° — —30°), pînă la folosirea lui.

Pentru o bună orientare, în tabelul 152 redăm pentru cele mai curente afecţiuni inframicrobiene produsele patologice indicate a fi recoltate şi trimise laboratoarelor de specialitate.

Cît priveşte tehnicile de recoltare a diferitelor produse patologice, ne vom rezuma numai la cele care, pentru diagnosticul virusologic, prezintă o cît de mică deosebire de cele folosite pentru diagnosticul bacteriologic curent.

Sîngele, pentru diferite inoculări la animalele de laborator, va fi recoltat în mod steril prin puncţie venoasă (5 ml). Pentru evitarea coagulării se va folosi fie metoda defibrinării prin agitare într-un balonaş cu perle de sticlă, fie adaosul de heparină 0,2 mg pentru 100 ml sînge[1], fie, mai rar, citratul de sodiu 3,8% luat în proporţie de 1 ml la 9 ml sînge.

În unele viroze (hepatite epidemice, coriomeningită limfocitară, denga etc.), pentru inoculare se poate folosi serul sanguin. În aceste cazuri, sîngele va fi recoltat direct într-o eprubetă sterilă şi va fi lăsat să coaguleze la gheţar, după care, cît se poate de repede, serul va fi decantat în mod steril.

Pentru diferitele *reacţii serologice*, sîngele venos va fi recoltat prin tehnica obişnuită (10 ml). Se va prefera obţinerea a cel puţin 2 probe (una la începutul bolii, o a doua la 8—18 zile interval, de preferinţă în convalescenţă). Dacă prima recoltare se face tîrziu, la sfîrşitul bolii sau în convalescenţă, proba a doua va trebui prelevată după 25—30 zile. Aceasta deoarece, în acest fel, în unele afecţiuni se va putea constata o diminuare a titrului anticorpilor serici, ceea ce va uşura diagnosticul.

---

[1] Pentru 10 ml sînge este suficientă numai clătirea seringii cu soluţie de heparină.

TABELUL 152

Produsele patologice indicate a fi recoltate în diferite inframicroboze, în vederea diagnosticului [1]

Inframicroboza (în ordine alfabetică)	Lichid cefalorahidian	Sînge	Sînge frotiu	Salivă	Fecale	Secreție din nazofaringe	Secreție conjunctivală	Secreție uretrală	Suc, puroi ganglionar	Lichid din vezicula cutanată mucoasă	Fragment din leziuni mucoase, tegument, cruste	Observații
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Adenoviroze (A.P.C.)				++	++	+++	+					Se va recolta și sînge pt. examene serologice
Conjunctivită cu incluzii							++	+				Idem
Coxsackie					+							
E.C.H.O.					+							Idem
Encefalită (diferite tipuri)	+	++										
Febră aftoasă										+		
Febre exantematice		+										Idem
Febră galbenă		+										Idem
Febră papataci		+										Idem
Febră Q		++				+						
Gripă						+						Idem
Guturai						+						
Hepatite epidemice		+										Se va recolta și sînge pt. examene serologice
Herpes					+					++		
Limfocitoză infecțioasă			++		+							Idem
Limfogranulomatoză venerică									+			Idem
Meningite cu lichid clar	+	++			+++	+						Idem
Moluscum contagiosum											++	Idem
Mononucleoză infecțioasă		+	++									Idem
Oreion	+	++		+								Idem
Pesta aviară (conjunctivită)		+					++					
Pneumonii virotice		+		++		+						Idem
Poliomielită					++	+						Idem
Psittacoză-ornitoză		+		++	+	++						Idem
Rubeolă			+									
Rujeolă		+				++						Idem
Tifos exantematic		+										
Trahom							++				+	
Turbare				+								Se va recolta și sînge pt. examene serologice
Uretrită cu incluzii							+	++				Idem
Vaccină		+								++		Idem
Varicelă										++	+	Idem
Variolă		+				++				+++	+	Idem

---

[1] În cazurile în care se recomandă recoltarea mai multor probe, numărul de cruci indică prioritatea

Sîngele pentru *frotiuri* va fi recoltat prin puncție, din deget, de asemenea după tehnica obișnuită.

Saliva va fi prelevată, înainte ca bolnavul să-și fi făcut toaleta bucală, în cantitate de cîțiva ml, într-o cutie Petri sau într-un pahar conic steril. Se recomandă folosirea cît mai urgentă a acestui produs, datorită riscului inactivării virusului de către unele substanțe prezente în salivă. De la copii, saliva se obține cu ajutorul unor mici tampoane de vată introduse și menținute puțin timp în cavitatea bucală.

Secrețiile nazale și nazo-faringiene vor fi recoltate direct prin expectorare sau suflarea puternică a nasului într-o cutie Petri sterilă sau cu ajutorul unei spălături nazo-faringiene. Recoltarea se recomandă a se face dimineața, imediat după trezirea bolnavului.

Spălătura nazo-faringiană se execută în felul următor:

Bolnavul este ținut cu capul în extensie forțată. Cu ajutorul unei seringi sterile de 10 ml — la al cărei ambou se fixează un mic tub de cauciuc (3 cm, cu diametrul de 5 mm) și al cărui capăt liber, tăiat oblic, este introdus într-o nară — se injectează 10 ml soluție sterilă de NaCl 8,5$^{0}/_{00}$. Imediat bolnavul apleacă brusc capul și lasă să se scurgă din gură, într-un pahar conic sau într-o cutie Petri sterilă, lichidul injectat. Pentru transport, acesta va fi transvazat într-o eprubetă sterilă.

De la copiii mici secrețiile nazale se obțin cu ajutorul unor tampoane de vată sterilă, introduse în nas.

Datorită prezenței în salivă și în mucus a unor substanțe inactivante față de unii inframicrobi, se recomandă folosirea produsului de spălătură cît mai urgent după recoltare, iar în caz că aceasta nu este posibilă, congelarea lui.

Secrețiile conjunctivale se obțin, fie cu ajutorul unei anse de platină bacteriologică, cu care se face o ușoară raclare a conjunctivei, în special la nivelul fundului de sac, după care produsul recoltat va fi agitat în cîteva picături de diluant[1] într-o eprubetă sterilă, fie prin aspirație într-o pipetă Pasteur cu marginile bine rodate. Și în acest caz, secreția o dată recoltată va fi barbotată în cîteva picături de diluant.

Secreția uretrală se prelevează după cum urmează:

— *La bărbat* se șterge meatul și fosa naviculară cu un tampon cu ser fiziologic steril și apoi, cu ajutorul unei anse de platină, încălzită la flacără și răcită, care se introduce în canalul uretral 5—6 mm, se raclează ușor pereții laterali și cel superior. Secreția obținută se agită în cîteva picături din lichidul diluant, de asemenea într-o eprubetă sterilă.

— *La femeie*, secreția va fi recoltată în același mod, la nivelul orificiului cervical.

Puroiul ganglionar se va obține prin puncționarea aseptică a ganglionului pe cale de supurație, cu ajutorul unui ac mai gros de seringă avînd grijă ca operația să se facă înainte de fistulizare, care ar putea provoca infecții secundare microbiene.

Conținutul veziculelor cutanate sau mucoase se recoltează, fie cu ajutorul unei pipete Pasteur fin efilate, fie cu ajutorul unui ac fin de seringă.

Se aseptizează suprafața leziunii tegumentare cu ajutorul unui tampon cu tinctură de iod și apoi se pătrunde cu vîrful pipetei sau al acului în interiorul veziculei sau pustulei. Lichidul se aspiră în capilar sau în seringă, după care este barbotat în cîteva picături de diluant.

Uneori lichidul din capilar va putea fi transportat la laborator chiar în pipetă, prin închiderea capilarului la flacără, bineînțeles după ce va fi deplasat prin aspirare, pentru a nu fi influențat de temperatura ridicată.

Leziunile tegumentare uscate, crustele, vor fi prelevate cu ajutorul unei mici chiurete sau cu ajutorul unei pense și foarfece fine. Ele vor fi introduse într-o eprubetă sterilă și apoi menținute la ghețar; dacă este necesară o conservare îndelungată, vor fi introduse în glicerină tamponată și menținute la temperaturi joase.

Materiile fecale (aproximativ 5—10 g pentru fecale solide, 5 ml pentru fecale diareice) vor fi recoltate, fie în cutii Petri sterile, fie în recoltoare speciale, prevăzute cu dop de cauciuc și o mică linguriță de lemn sau sticlă. Se recomandă ca bolnavul să defece în vase sterilizate prin fierbere sau opărite cu apă fiartă, și apoi răcite cu soluție fiziologică sau apă distilată sterilă.

Peste materiile fecale recoltate se adaugă 2—4 picături dintr-o soluție de penicilină (200 000 u.i./10 ml apă distilată) și 1—2 picături dintr-o soluție de streptomicină (1 g/10 ml apă distilată).

Cu foarte bune rezultate se pot folosi tampoane de vată sterile, de tipul celor întrebuințate pentru prelevările de exsudate amigdaliene, menținute în eprubete cu 0,5 ml soluție Hanks, la care s-au adăugat și antibiotice (200 u.i. penicilină și 50 μg streptomicină pentru fiecare ml). După introducerea în rect, tampoanele sînt agitate cîteva minute în soluția Hanks din fundul eprubetei și apoi suspensia este decantată într-o altă eprubetă sterilă, închisă cu dop de cauciuc.

Pînă la folosire, atît materiile fecale, cît și suspensiile realizate cu ajutorul tampoanelor se mențin în ghețar sau, de preferință, în congelator. În acest mod, unele virusuri (poliomielitice, ECHO, Coxsackie) se pot conserva în perfecte condiții cîteva luni de zile.

---

[1] Alegerea diluantului este în funcție de inframicrobul respectiv și mai ales de metoda care va fi folosită (soluție fiziologică de NaCl 8,5$^{0}/_{00}$ pentru inoculări la animale, apă distilată pentru inoculare în oul embrionat, mediu nutritiv pentru culturi celulare).

★

Toate indicațiile date mai sus se referă la recoltarea produselor patologice de la bolnavii cu diferite inframicrobioze.

De la cadavru însă, nu vom preleva decît cu totul excepțional unele din produsele patologice recoltate în mod curent de la bolnavi; vom utiliza în schimb, cu predilecție, fragmente de organe recoltate aseptic, cît mai rapid după moarte.

Recoltarea unor fragmente de țesuturi sau organe, după o perioadă mai mare de 4—5 ore după moartea individului, reduce cu mult posibilitățile de izolare a diferiților inframicrobi. Din această cauză, atunci cînd este necesară stabilirea cu precizie a unui diagnostic *post mortem*, necropsia se va face în primele ore după deces.

Se vor preleva în special fragmente de ficat (hepatite epidemice, febră galbenă), creier (encefalite, meningite, tifos exantematic etc.), măduvă (poliomielită), plămîn, trahee (gripă, psittacoză) etc. Din fiecare organ se vor recolta fragmente pentru izolare de germeni și separat pentru examene histopatologice.

Pentru studii histologice, fragmente subțiri din fiecare organ indicat vor fi introduse în lichidul fixator Duboscq-Brasil-Bouin (alcool 90°, 150 ml; formol comercial 60 ml; acid acetic glacial 15 ml; acid picric 1 g) sau în formol 15% (formol comercial 15 ml, apă distilată 85 ml).

Pentru izolarea de inframicrobi, recoltarea diferitelor fragmente de organe se va face luînd toate măsurile de asepsie, după tehnica obișnuită a practicii necropsiei anatomopatologice.

Facem o mențiune specială pentru recoltarea fragmentelor din măduva spinării, necesare în special pentru diagnosticul poliomielitei. În acest caz, se vor preleva cîte 2 rondele de la nivelul umflăturilor cervicale și lombare. O dată recoltate, fragmentele de organe se vor menține în ghețar în cutii Petri sterile sau, de preferință, în flacoane cu glicerină tamponată.

Pentru cazurile în care este totuși necesară recoltarea de la cadavru a *sîngelui*, *lichidului cefalorahidian*, *fecalelor* etc., se va proceda astfel:

Sîngele se recoltează din inimă sau din venele cubitale; se va prefera însă recoltarea din inimă.

Pentru aceasta se va începe necropsia cu cutia toracică, avînd grijă ca în timpul scoaterii sternului să nu se lezeze venele mari mediastinale și cele ale gîtului.

Se secționează pericardul și apoi, cu o spatulă încălzită la roșu, se cauterizează o porțiune de pe suprafața anterioară a ventriculului drept.

Se pătrunde cu acul de seringă prin această porțiune cauterizată, sau cu o pipetă Pasteur, și se aspiră cîțiva ml sînge.

Puncționarea venelor cubitale se realizează, fie atunci cînd nu se poate practica necropsia, fie în cazurile în care prelevarea se face după ce aceasta s-a terminat. Se aseptizează cu tinctură de iod pielea plicii cotului, se incizează cu bisturiul și se descoperă vena cubitală. Se incizează cu atenție vasul și, cu ajutorul unei seringi sau cu o pipetă Pasteur, se aspiră cantitatea de sînge necesară.

Lichidul cefalorahidian se obține prin puncție suboccipitală după reperele obișnuite, făcîndu-se o flexie puternică a capului cadavrului pe torace.

Materiile fecale se recoltează cu ajutorul unei lingurițe sau spatule sterile, dintr-o ansă intestinală, după deschiderea sterilă a acesteia.

Secrețiile tractului respirator se obțin prin raclare cu o spatulă sterilă a mucozităților din interiorul traheei, după secționarea acesteia.

★

O dată materialul infecțios prelevat, el va trebui transportat la laboratorul de specialitate, pentru a fi folosit, fie imediat, fie după conservarea lui în condiții speciale.

TRANSPORTUL PRODUSELOR PATOLOGICE

Transportul materialului prelevat reprezintă o problemă importantă de care depinde, în bună măsură, calitatea diagnosticului inframicrobiologic.

Produsele recoltate vor fi transportate cît mai rapid posibil, la o temperatură de 0° sau chiar mai redusă.

În practică, dacă transportul se face iarna și la distanțe mici, eprubetele sau vasele de sticlă vor fi menținute într-o cutie de carton sau lemn, în nici un caz direct în mîna curierului.

În caz că transportul se face în anotimpul cald sau la distanțe mari, *este obligatorie* introducerea recipientelor care conțin produsele virulente, în termosuri cu gheață sau cu amestec de zăpadă carbonică și alcool.

Trimiterea la distanțe mari prin poștă se va face, de asemenea, în vase izoterme de tablă, cu gheață sau cu zăpadă carbonică. În aceste condiții, se recomandă transportul cu avionul.

Dacă la nivelul la care s-au recoltat produsele patogene există posibilitatea unei liofilizări, problema transportului devine mult mai simplă, produsele liofilizate putînd fi comod transportate la temperatura ambiantă. De reținut că metoda liofilizării nu se poate aplica în mod curent pentru enterovirusuri.

În caz că se expediază probe de sînge pentru cercetări serologice, se va avea grijă să se trimită numai serul sanguin nehemolizat, decantat în condiții perfecte de asepsie și evitîndu-se variații repetate de temperatură.

Etichetarea. O atenție deosebită va trebui dată etichetării produselor patologice recoltate. Subestimarea acestui element simplu poate conduce adesea la confuzii penibile, la erori de diagnostic și chiar la accidente grave.

Se va da deci o atenție deosebită marcării produselor recoltate.

În acest scop, se vor specifica pe fiecare recipient, de preferință pe un fragment de leucoplast, *numărul de ordine*, *numele bolnavului*, *natura produsului și data recoltării*.

Cînd transportul se face în amestec refrigerent (alcool + zăpadă carbonică), se va avea grijă ca de recipient să se prindă și o ață rezistentă, la al cărei capăt liber se atașază o etichetă de carton cu toate datele necesare și care va fi lăsată să atîrne în afara vasului izolator (termos).

O dată cu trimiterea materialului infecțios se recomandă a se completa o fișă cu cîteva date privind aspectul clinic și epidemiologic al cazului respectiv, fapt care va ajuta mult pe experimentator în dirijarea investigațiilor sale.

TEHNICI MAI FRECVENT FOLOSITE PENTRU IZOLAREA INFRAMICROBILOR

Materialul patogen recoltat în vederea izolării și identificării unui germen inframicrobian este folosit cel mai des pentru inocularea la animale de laborator sensibile, în oul de găină embrionat sau în culturi de celule.

Unele produse se folosesc ca atare (lichidul de spălătură nazo-faringeană, lichidul cefalorahidian), altele (lichid vezicular, sînge total, ser sanguin, suc gastric etc.), după diluare convenabilă în diferite soluții speciale [1], sau după pregătire prealabilă mai complexă (triturare, diluare, centrifugare în cazul diverselor organe; diluare, centrifugare, filtrare, tratare cu eter, în cazul materiilor fecale etc.).

INOCULAREA LA ANIMALE DE LABORATOR

Una dintre metodele cele mai des folosite pentru identificarea și izolarea diferiților inframicrobi este inocularea la animalele de laborator sensibile. Metoda prin realizarea unei boli experimentale — pentru foarte mulți inframicrobi caracteristică — prin leziunile histopatologice care pot fi puse în evidență în țesuturile animalului inoculat, prin izolarea și transmiterea în serie a germenului specific, izbutește să stabilească de foarte multe ori diagnosticul infecției virotice cercetate.

Într-adevăr, după specia animalului care a reacționat pozitiv, după manifestările morbide (febră, paralizii etc.), după modificările macroscopice tegumentare, corneene, testiculare etc., după infecțiozitatea diferitelor organe, după localizarea și aspectul leziunilor microscopice — care capătă o și mai mare valoare prin identificarea incluziilor celulare caracteristice pentru numeroase viroze — inframicrobiologul obține, așa cum s-a mai semnalat, prețioase indicații pentru precizarea diagnosticului. Aceste date vor putea fi transformate în adevăruri de netăgăduit, prin asocierea unor probe imunologice complementare (reacția de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare, testul de seroneutralizare, imunitatea încrucișată etc.).

Deși cele mai multe viroze au putut fi trecute curent la animalele de laborator, excepție făcînd un mic număr de afecțiuni (zona zoster, hepatita epidemică, encefalita postvaccinală etc.), astăzi, prin dezvoltarea deosebită pe care au luat-o culturile celulare, experimentarea pe animale în scopul izolării virusurilor caracteristice este din ce în ce mai puțin folosită, rămînînd limitată mai ales la germenii necultivabili în diferite celule „*in vitro*". Experimentarea pe animale de laborator este însă în continuare folosită pentru identificarea unor virusuri izolate, pentru prepararea de seruri imune, pentru diferite cercetări de specialitate etc.

---

[1] Dintre numeroasele lichide diluante propuse pentru experimentarea cu virusuri, cele mai bune rezultate, superioare celor obținute cu ajutorul clasicei soluții izotonice de NaCl $8,5^0/_{00}$, le furnizează serul inactivat de cal 2 % în apă distilată sau în soluție de NaCl $8,5^0/_{00}$, lichidele embrionare de pasăre sau soluția Hanks. Aceasta din urmă va fi folosită constant în inoculările în culturi celulare.

Transmitera bolii la animalele sensibile nu este însă totdeauna o operație simplă; pentru realizarea ei sînt necesare cunoștințe variate, este nevoie de o foarte bună tehnică experimentală, uneori de diminuarea rezistenței animalului (cortizon, iradiere etc.).

Sînt extrem de numeroase și variate căile de inoculare pentru fiecare animal de laborator, sînt numeroase tehnicile de prelevare a produselor patologice și a materialelor necropsice de la animalele infectate.

Vom alege deci și vom descrie numai tehnicile experimentale folosite mai frecvent la animalele utilizate în mod curent în laboratoarele de diagnostic virusologic (iepure, cobai, șobolan, șoarece adult, șoarece pui, hamster).

În tabelul 153 redăm speciile animale folosite pentru diagnosticul curent al celor mai importante inframicrobioze umane, precum și calea de inoculare de elecție.

În tabelul 154 redăm speciile animale folosite mai frecvent pentru prepararea serurilor imune necesare diagnosticului serologic uzual și identificării unor virusuri.

Din tabelele 153 și 154 reiese clar că astăzi, pentru izolarea unor inframicrobi, pentru realizarea unor probe complementare obligatorii pentru diagnostic, ca și pentru prepararea de seruri anti, dintre numeroasele animale de laborator se folosesc mai ales șoarecele adult și sugar, iepurele, cobaiul, hamsterul, șobolanul, găina, și mult mai rar dihorul și maimuța.

Vom descrie, în consecință, tehnicile mai frecvent folosite la aceste animale de laborator, tehnici la care — în general — este nevoie, în afară de experimentator, și de o persoană ajutătoare.

Indiferent de specia animală folosită, pentru bune rezultate se vor folosi animale în *perfectă stare de sănătate*, de preferință animale care anterior au stat sub observație, în carantină, 10—15 zile.

Dată fiind răspîndirea largă a coriomeningitei limfocitare printre șoareci, în laborator vor trebui să existe permanet șoareci care anterior au primit, pe cale cerebrală, mici cantități de bulion (injecția de bulion determină transformarea unei infecții latente, inaparente, în una aparentă). Bine înțeles că se vor reține numai animalele care s-au comportat perfect după injecția de probă.

Se va da totodată o atenție deosebit marcării animalelor în experiență fie cu sub-

TABELUL 153

Speciile animale și căile de inoculare elective pentru izolarea unor inframicrobi în scop diagnostic

Viroza (în ordine alfabetică)[1]	Specia animală	Calea de inoculare de elecție
Coriomeningită limfocitară	Șoarece Cobai	Intracerebrală
Coxsackie	Șoarece sugar	Subcutanată
Encefalite primitive	Șoarece	Intracerebrală
Gripă	Dihor Șoarece	Intranazală
Febră aftoasă	Cobai Șoarece sugar	Pielea metatarsului. Subcutanată
Herpes	Iepure Șoarece sugar	Corneeană Subcutanată
Limfogranulomatoză venerică	Șoarece	Intracerebrală
Ornitoză-psittacoză	Șoarece	Intranazală
Tifos exantematic Tifos pulmonar (febra Q)	Cobai	Intraperitoneală
Turbare	Hamster Șoarece Șobolan Cobai Iepure	Intracerebrală Intramusculară
Vaccină Variolă	Iepure Maimuță	Cutanată Corneeană Testiculară
Varicelă	Maimuță	Testiculară

---

[1] Au fost menționate numai inframicrobiozele pentru al căror diagnostic etiologic se folosește cel mai frecvent inocularea la animalul sensibil

TABELUL 154

Speciile animale şi calea de elecţie pentru administrarea virusurilor în vederea preparării serurilor imune

Viroza (în ordine alfabetică)	Specia animală recomandată	Calea de administrare a antigenului
A.P.C.	Iepure	Intravenoasă
Coriomeningită limfocitară	Cobai	Intraperitoneală
Coxsackie	Şoarece adult Şobolan Cobai	Intraperitoneală, intranazală Subcutanată, intraperitoneală
ECHO	Iepure	Intramusculară
Encefalite primitive	Iepure Cobai	Subcutanată, intraperitoneală
Gripă	Cocoş Şobolan Iepure	Intraperitoneală, intravenoasă Intranazală, intraperitoneală
Herpes	Maimuţă Iepure Cobai	Intradermică, intramusculară, intraperitoneală, intracerebrală
Newcastle (conjunctivită)	Găină	Intramusculară, intraperitoneală
Oreion	Cobai Cocoş	Intramusculară, intraperitoneală
Ornitoză-psittacoză	Cocoş Iepure	Subcutanată intramusculară, intraperitoneală
Poliomielită	Maimuţă Iepure Capră	Intramusculară, intraperitoneală
Rujeolă	Cobai	Intramusculară, intraperitoneală
Tifos exantematic Tifos pulmonar (febra Q)	Cobai Iepure	Intraperitoneală Intramusculară, intravenoasă
Turbare	Iepure	Intradermică, intramusculară, intraperitoneală
Vaccină	Iepure	Cutanată, intravenoasă

stanţe colorante, fie cu numere metalice (în cazul animalelor mari).

INOCULAREA LA IEPURE

Inocularea tegumentară se face în regiunea flancurilor. Ajutorul ţine animalul fixat pe masă, culcat pe o parte. După ce se epilează regiunea de inoculat, aceasta este bine înmuiată cu apă şi săpun şi apoi rasă cu briciul. Teritoriul astfel pregătit este apoi bine spălat cu apă distilată sterilă şi frecat cu o cîrpă aspră. Cu ajutorul unei pipete Pasteur, ruptă proaspăt, se fac o serie de scarificări superficiale, paralele, avînd grijă să nu se producă sîngerări (fig. 471). Într-un timp următor, teritoriul scarificat este badijonat cu un tampon înmuiat în emulsia virulentă. Animalul nu va fi eliberat pînă cînd pielea sa nu va fi uscată.

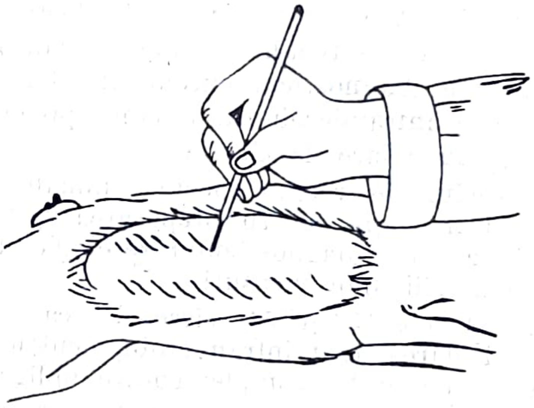


Fig. 471. — Inoculare tegumentară la iepure.

Această cale de inoculare este folosită în special pentru virusul vaccinal.

Inocularea subcutanată se practică, fie în regiunea flancurilor, fie în cea a coapselor, după epilarea şi aseptizarea cu tinctură de iod diluată a unui mic teritoriu.

Inocularea intramusculară se practică în muşchii coapsei, cefii sau şanţurilor vertebrale.

Pentru inocularea în muşchii coapsei, experimentatorul fixează, sub braţul său stîng, capul şi membrele anterioare ale iepurelui, în timp ce cu mîna stîngă îi ţine membrele posterioare. Cu mîna dreaptă injectează emulsia virulentă în coapsă, după epilarea şi aseptizarea regiunii respective.

Inocularea în *mușchii șanțurilor vertebrale* este și mai comodă. Animalul este ținut ca mai sus, dar în plus experimentatorul, cu mîna stîngă cu care ține membrele posterioare, apasă pe abdomen și bombează spatele animalului; în felul acesta mușchii proemină favorabil. Cu seringa ținută în mîna dreaptă se inoculează emulsia respectivă, fie în mușchii din partea dreaptă, fie în cei din cea stîngă, bineînțeles după epilarea și aseptizarea regiunii (fig. 472).

Inocularea în *mușchii cefii* se practică mai ales pentru diagnosticul turbării (fig. 473).

Experimentatorul fixează regiunea posterioară a iepurelui sub brațul său stîng, iar cu mîna stîngă îi ține labele anterioare și urechile, producînd în felul acesta și flectarea forțată a capului animalului. Cu seringa ținută în mîna dreaptă introduce suspensia virulentă în mușchii cefii, paralel cu coloana vertebrală, în sensul lungimii fasciculelor musculare, de asemenea, după epilarea și aseptizarea prealabilă a teritorului.

Inocularea intraperitoneală se face la jumătatea distanței dintre torace și pubis, aproximativ la jumătate de centimetru în dreapta sau în stînga liniei mediane.

Animalul este ținut cu abdomenul în sus de către ajutor, care-i fixează capul și membrele anterioare sub brațul său stîng și imobilizează cu mîna dreaptă membrele posterioare, pe care le ține într-un plan mai ridicat.

Experimentatorul, cu o mișcare bruscă, traversează cu acul pielea epilată și aseptizată cu tinctură de iod, stratul muscular și peritoneul. În momentul în care acul nu mai întîmpină rezistență, semn că a pătruns în cavitatea peritoneală, se injectează suspensia virulentă, antigenul etc. Se poate injecta pînă la 10 ml lichid.

Calea peritoneală este folosită la iepure, în special pentru imunizare.

Inocularea intravenoasă se execută ușor în vena marginală a urechii. Se epilează regiunea, se badijonează cu xilol sau toluol, și ajutorul, care ține iepurele pe masa de laborator, face stază prin comprimarea venei la baza urechii. În acest fel vena devine proeminentă.

Experimentatorul, după aseptizarea cu tinctură de iod diluată a regiunii, fixează urechea iepurelui pe indexul său stîng și cu mîna dreaptă introduce acul seringii, cu bizoul în sus, în lungul venei marginale, spre baza urechii. Se introduce încet și sacadat lichidul virulent (maximum 10 ml).

Inocularea pe cornea scarificată se practică în special pentru diagnosticul herpesului și variolei.

Se realizează în mai mulți timpi. Ajutorul imobilizează iepurele, menținîndu-i partea posterioară sub brațul său stîng. Cu mîna stîngă prinde labele anterioare și urechile animalului. Acestea sînt îndoite pe capul iepurelui de partea inversă ochiului care va fi inoculat (fig. 474).

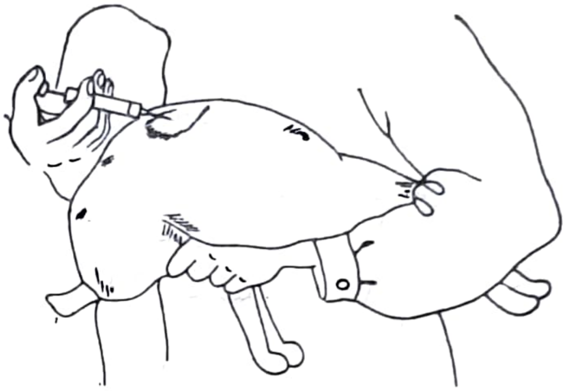


Fig. 472. — Inoculare în mușchii spatelui la iepure.

Experimentatorul, cu ajutorul unui instrument bont (de preferință cu mînerul plat al unui bisturiu), exercită o presiune nu prea puternică pe pleoapa inferioară, la baza globului ocular (fig. 475). În acest mod se realizează ușor exorbitarea ochiului, care apoi se menține în această poziție cu ajutorul policelui, introdus sub globul ocular cu unghia în sus.

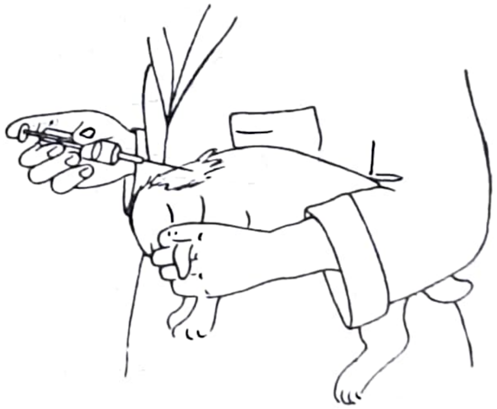


Fig. 473. — Inoculare în mușchii cefii la iepure.

Cu ajutorul unui ac de disociație sau cu vîrful unui bisturiu se fac cîteva scarificări superficiale, în special la nivelul limbului, și apoi cu ajutorul unui tampon înmuiat în emulsia virulentă se badijonează teritoriul scarificat, după care ochiul este lăsat să reintre normal în orbită.

Inocularea intracerebrală, mult folosită în turbare și herpes, se execută simplu la iepure. Animalul este imobilizat cu capul pe masă de ajutor, care fixează cu fiecare mînă cîte o ureche, avînd grijă în același timp să țină întinsă, trăgînd înapoi, și pielea capului. Membrele posterioare ale animalului nu vor fi lăsate să se sprijine pe masă; ele vor atîrna libere la marginea mesei.

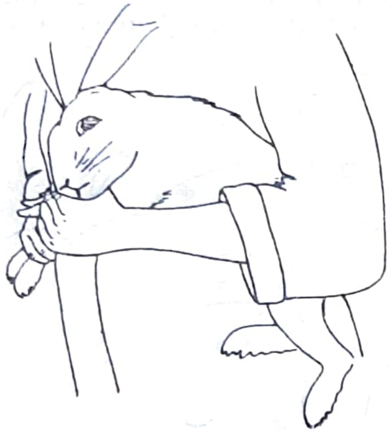


Fig. 474. — Imobilizarea iepurelui pentru inocularea corneeană.

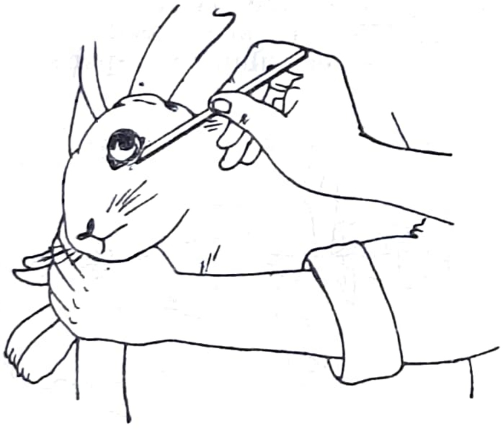


Fig. 475. — Exorbitarea globului ocular la iepure în vederea inoculării corneene.

Părul animalului va fi smuls pe o regiune de 2—4 cm, situată între protuberanța occipitală superioară și protuberanța orbitară externă. După aseptizare atentă cu tinctură de iod a regiunii, se face, cu ajutorul unui trepan[1], care pătrunde prin piele, un orificiu în tăblia osoasă, într-un punct situat la jumătatea liniei dintre cele două protuberanțe (occipitală și orbitară), la jumătate centimetru în afara liniei mediane. Se scoate trepanul cu grijă, pentru a nu modifica planurile, care se mențin fixe cu ajutorul indexului și policelui stîng. Prin orificiul astfel realizat se introduce acul seringii (0,5—1 cm), un ac subțire (tip subcutanat), și se inoculează încet 0,25—0,30 ml din suspensia virulentă. Se retrage acul și se lasă liberă pielea capului. Se badijonează cu tinctură de iod și eventual se aplică o picătură de colodiu pe minusculul orificiu al puncției.

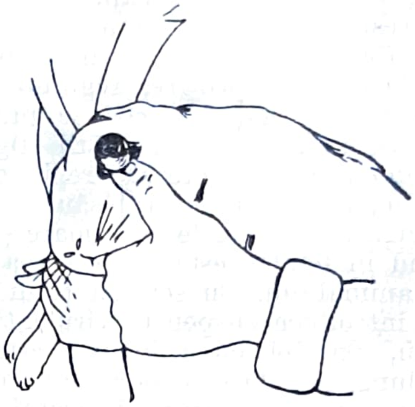


Fig. 476. — Fixarea cu ajutorul policelui a ochiului exorbitat.

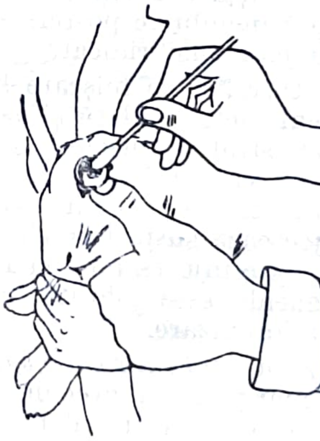


Fig. 477. — Badijonarea corneei scarificată.

---

[1] În lipsa unui *trepan cu cursor*, recomandabil (fig. 478) se poate construi un instrument mai simplu, constituit dintr-un vîrf triunghiular, lung de 3 mm și gros de 1 mm, în continuarea unui mîner cilindric de metal cu dimensiuni de 10 cm lungime și diametru de 0,8 cm — *trepanul simplu* (fig. 479).

Inocularea intratesticulară, folosită pentru diagnosticul diferenţial al variolei şi vaccinei, se realizează astfel:

Ajutorul ţine iepurele cu abdomenul în sus, fixîndu-i capul şi membrele anterioare sub braţul stîng, în timp ce cu fiecare mînă ţine cîte unul din membrele posterioare pe care le depărtează. Dat fiind că la acest animal testiculele sînt criptorhice, experimentatorul va face, cu una din mîini, o mişcare de apăsare şi tracţiune în acelaşi timp, dinspre mijlocul abdomenului către scrot; în acest mod testiculele ocupă bursele, devenind evidente. Cu policele, indexul şi inelarul stîng se va prinde, prin intermediul scrotului, testiculul care devine astfel proeminent. După aseptizarea tegumentului cu tinctură de iod diluată, experimentatorul, cu mîna dreaptă, va introduce acul seringii în plin ţesut testicular şi va injecta suspensia virulentă, avînd grijă să dirijeze acul în cîteva direcţii. Acul se retrage brusc şi în acelaşi timp se eliberează testiculul, care-şi va relua locul.

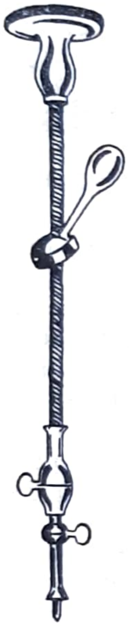


Fig. 478. — Trepan cu cursor.

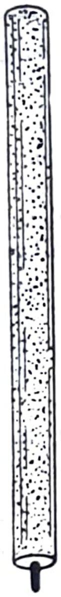


Fig. 479. — Trepan simplu.

Tehnici de recoltare a materialului patologic necesar diagnosticului

Sîngele pentru frotiuri sau numărătoare de globule se obţine prin înţeparea, cu ajutorul unui ac de seringă, a venei marginale a urechii, după producerea stazei printr-o compresiune uşoară la baza urechii.

Pentru obţinerea unei cantităţi mai mari de sînge (2—5 ml) (pentru cercetări serologice) vom face o puncţie în vena marginală a urechii. *Spre deosebire de inocularea intravenoasă, pentru prelevare, acul seringii va fi dirijat către vîrful urechii.*

Atunci cînd este necesară o cantitate mare de sînge (15—30 ml), vom practica de preferinţă o puncţie cardiacă.

Puncţionarea inimii este o operaţie simplă, ce se poate practica şi repeta, fără risc pentru animal, bineînţeles luînd toate măsurile de asepsie.

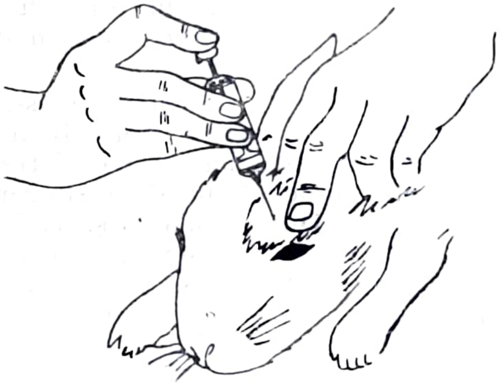


Fig. 480. — Inoculare intracerebrală la iepure.

Iepurelui, bine fixat pe spate, i se epilează şi dezinfectează cu tinctură de iod regiunea sternală. Se reperează cel de-al treilea spaţiu intercostal stîng şi la 5 mm în afara marginii sternale se pătrunde cu un ac cu bizou scurt, cu o mişcare bruscă, avînd grijă ca acul să fie îndreptat uşor oblic dinainte înapoi. În felul acesta, pătrunzînd 2—2,5 cm, vîrful acului se va găsi în ventriculul drept; sîngele care iese în sacade probează aceasta. Se adaptează seringa, se aspiră încet cantitatea de sînge necesară (nu se va depăşi 30 ml) şi apoi, cu o mişcare bruscă, se retrage acul.

După recoltarea sîngelui se recomandă introducerea intravenos a unei cantităţi egale de ser fiziologic glucozat 2%.

Operaţia se poate repeta de mai multe ori la cîteva zile interval (dacă s-au extras 30 ml, următoarea sîngerare se va face cel mai devreme după 7 zile).

Enuclearea globului ocular (operaţie necesară în diagnosticul de laborator al variolei, proba Paul) se execută în felul următor :

Animalul este adormit cu ajutorul vaporilor de eter. Se exorbitează globul ocular după tehnica obişnuită şi cu ajutorul unei foarfeci curbe se secţionează pediculul vasculo-nervos retroocular ; hemoragia care se produce încetează destul de repede. Se prind pleoapele cu două agrafe Michel.

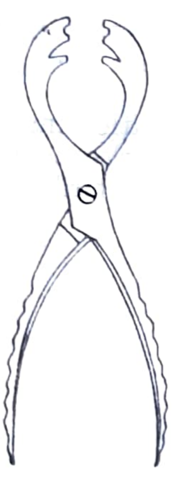


Fig. 481. — Cleşte Davier-Farabeuf.

Extirparea testiculului se realizează astfel :

Se fixează iepurele cu abdomenul în sus, imobilizîndu-i bine membrele.

În caz că testiculul care ne interesează nu este în burse, se va aduce cu manopera obişnuită.

În cazul în care s-a dezvoltat orhita, nu este necesară această manevră, căci testiculul tumefiat nu părăseşte scrotul.

După epilarea şi badijonarea cu iod a regiunii, se pune un mic cîmp chirurgical, steril, şi se fixează cu o pensă Kocher, astfel încît să strîngă şi o porţiune din pielea scrotului şi să nu permită retragerea testiculului înspre abdomen.

Se dă narcoza animalului, după care, cu un bisturiu, se face o incizie a scrotului de-a lungul testiculului. Se eliberează testiculul cu ajutorul unei foarfeci închise sau cu o pensă. Se prinde vîrful testiculului cu o pensă Péan şi se face cu un fir de aţă chirurgicală o puternică legătură a pediculului. Într-un timp următor se secţionează testiculul cu tunicile sale, la 1/2 cm sub ligatură. Texticulul extirpat se introduce într-o cutie Petri sterilă, după care se secţionează un fragment şi se introduce în amestecul fixator pentru studii histopatologice.

Incizia scrotală se închide cu două agrafe Michel şi se badijonează cu tinctură de iod.

Necropsia iepurelui pentru examen macroscopic şi recoltarea de fragmente de organe pentru controlul biologic şi microscopic se execută în condiţii asemănătoare cu cea practicată pentru examenele bacteriologice. Vom descrie, în consecinţă, numai prelevarea creierului, necesar în special diagnosticului de laborator al neurovirozelor.

Menţionăm că necropsia trebuie practicată cît mai repede de la moartea animalului. Pentru obţinerea unor rezultate cît mai bune, în special cînd se urmăreşte izolarea unui virus, se recomandă sacrificarea animalului în agonie.

Dintre tehnicile de sacrificare folosite sînt de preferat sîngerarea prin secţionarea carotidelor, injectarea de cloroform în vena marginală a urechii (1 ml), sau introducerea intracardiacă a 5—10 ml aer cu seringa.

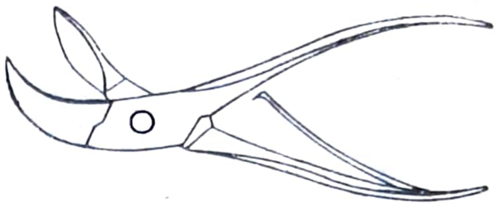


Fig. 482. — Craniotom (cleşte Pasteur).

În prima fază a necropsiei se va preleva sistemul nervos central. Pentru aceasta, iepurele va fi fixat cu faţa ventrală într-o tavă specială de metal, cu marginile găurite, legînd întinse picioarele cu ajutorul unor sfori trecute prin găurile tăvii, la niveluri convenabile, şi avînd grijă ca gîtul iepurelui să fie situat la marginea tăvii.

Necropsia va fi făcută *obligatoriu în condiţii de asepsie*, cu instrumente sterilizate prin fierbere.

Tehnica prelevării creierului este următoarea :

Ajutorul ţine botul animalului cu un cleşte Davier-Farabeuf (fig. 481). Experimentatorul, după ce îmbibă bine cu un tampon cu alcool blana şi pielea capului iepurelui, face cu bisturiul o incizie longitudinală a pielii capului, de la ceafă la botul animalului. Se disecă rapid pielea şi se decolează cele 2 hemiscalpuri pînă îndărătul urechilor, care se secţionează la bază.

Se disecă musculatura superficială dintre orbite şi apoi se picură tinctură de iod pe suprafaţa calotei. Este indicat ca din acest moment necropsierul să preia, în mîna stîngă, pensa cu care să ţină singur capul animalului.

Cu un craniotom (fig. 482, fig. 483) apucat cu mîna dreaptă, se face o secţiune a orbitei drepte, apoi a celei stîngi. În continuare, se secţionează osul frontal între cele două orbite.

După ce s-a executat secţionarea tăbliei osoase dintre orbite, se face brusc o mişcare de basculă, în urma căreia se ridică ambele oase frontale. Cu craniotomul se desprind aceste oase pînă la scizurile parietale perpendiculare pe scizura metopică.

Cu ajutorul craniotomului se incizează în dreapta şi stînga oasele parietale (fig. 484) şi apoi se introduce, sub ambele parietale, una din ramurile sale tăioase. O nouă mişcare bruscă de basculă permite ridicarea parietalelor pînă la occiput.

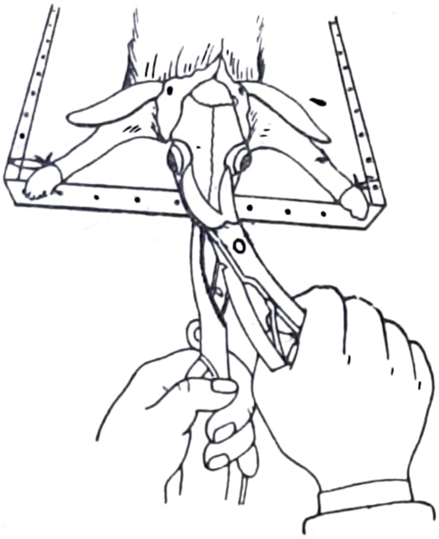


Fig. 483. — Tehnica prelevării creierului la iepure. Timpul I: secţionarea osului frontal între cele două orbite.

Se prinde occiputul între ramurile tăioase ale craniotomului, astfel încît ramura superioară să se găsească între os şi creier şi cea inferioară peste occiput, la baza lui. Se face o mişcare de basculă dinainte înapoi şi de jos în sus şi se întoarce astfel occipitalul (fig. 485), creierul şi cerebelul apărînd în totalitate.

Se incizează longitudinal cu foarfeca fină meningele, răsfrîngîndu-se apoi lambourile.

Se secţionează cu foarfeca fină un fragment minuscul (2 mm), din regiunea anterioară a encefalului şi se introduce într-un tub cu bulion pregătit dinainte. Controlul sterilităţii bacteriologice este obligatoriu la necropsia oricărui animal examinat pentru diagnostic inframicrobiologic.

Cu ajutorul foarfecei fine se secţionează partea cea mai anterioară a encefalului (lobii olfactivi), care se abandonează. Cu pensa şi foarfeca se ridică uşor creierul în partea sa anterioară şi se secţionează chiasma. Se introduce apoi foarfeca vertical în partea posterioară a creierului, între lobii occipitali şi *vermis*, şi se secţionează pedunculii cerebrali. Prin secţionarea nervilor cranieni, care se execută după ridicarea uşoară a creierului în partea posterioară, encefalul este total degajat.

Cu ajutorul pensei şi foarfecei, encefalul este luat în întregime (fig. 486) din cutia craniană şi plasat într-o cutie Petri sterilă.

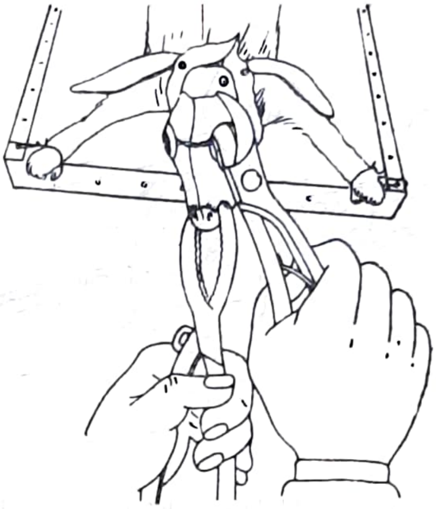


Fig. 484. — Timpul II: secţionarea osului parietal stîng.

Cu ajutorul foarfecei mari, se secţionează creierul transversal, la nivelul dintre cele 2 treimi anterioare şi treimea posterioară; fragmentul anterior va fi folosit pentru inoculări şi conservare, cel posterior va fi introdus în amestecul fixator (de preferinţă Dubosq-Brasil-Bouin), pentru examene histopatologice.

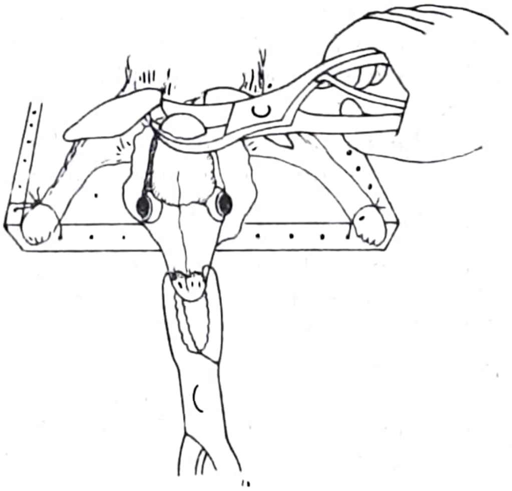


Fig. 485. — Timpul III: secţionarea osului occipital.

Cerebelul se recoltează foarte ușor după scoaterea creierului. Cu ajutorul costotomului se secționează osul occipital de o parte și de alta pînă la atlas și axis și apoi, cu ajutorul foarfecei fine se separă creierușul de bulb; este luat apoi între pensă și foarfecă și plasat, fie într-o placă Petri sterilă (dacă-l vom folosi pentru pasaje), fie în borcanul cu fixator.

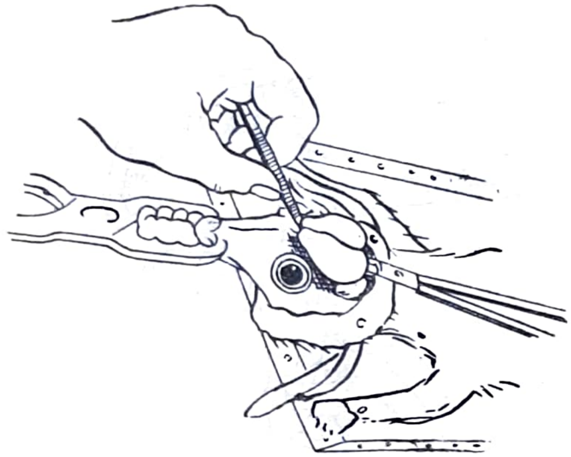


Fig. 486. — Timpul IV: prelevarea creierului cu ajutorul foarfecelui și al pensei.

INOCULAREA LA COBAI

Inocularea tegumentară, subcutanată și intraperitoneală se practică la această specie animală întocmai ca la iepure.

Inocularea intramusculară se face de obicei în mușchii coapsei. Ajutorul ține cobaiul, în timp ce experimentatorul apucă unul din membrele posterioare, îl întinde ușor și pătrunde cu acul seringii în masa mușchilor coapsei, bineînțeles prin pielea în prealabil epilată și badijonată cu tinctură de iod.

Pentru diagnosticul turbării, în special atunci cînd se inoculează o suspensie de nevrax dubioasă din punct de vedere al sterilității, inocularea se execută în *mușchii cefii.* Pentru aceasta animalul este imobilizat de ajutor, care sub mîna stîngă ține corpul cobaiului, iar cu ambele mîini îi flectează capul. Inocularea poate fi făcută și fără ajutor: cobaiului ținut pe masă i se flectează puternic capul cu mîna stîngă, iar cu dreapta se face inocularea, (fig. 487).

Se smulge părul animalului în regiunea cefii, se badijonează cu tinctură de iod și apoi se introduce acul cu grijă în masa musculară, paralel cu coloana vertebrală, injectîndu-se 0,5—1 ml din suspensia virulentă.

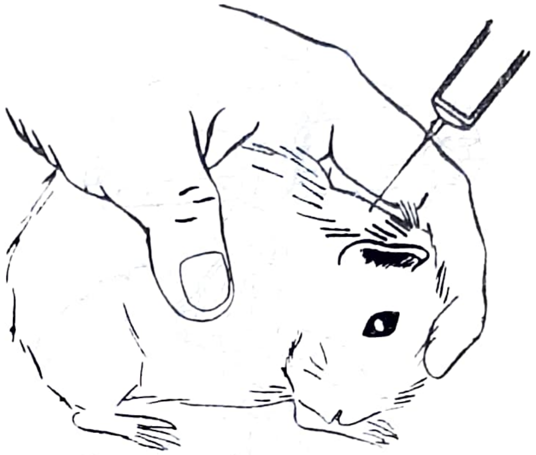


Fig. 487. — Inoculare în mușchii cefii la cobai.

Inocularea în pielea metatarsului este folosită în febra aftoasă și mai rar în herpes.

Se ține cobaiul de către ajutor cu capul în jos, după care experimentatorul apucă laba unuia din membrele posterioare ale animalului, pe care o fixează pe indexul său stîng cu ajutorul policelui aceleiași mîini. Se aseptizează pielea metatarsului cu tinctură de iod și se introduce pe o distanță de 1—1,6 cm un ac subțire, orientat cu bizoul în sus, în grosimea pielii, paralel cu suprafața tegumentului. Se injectează, 0,1—0,2 ml din suspensia virulentă.

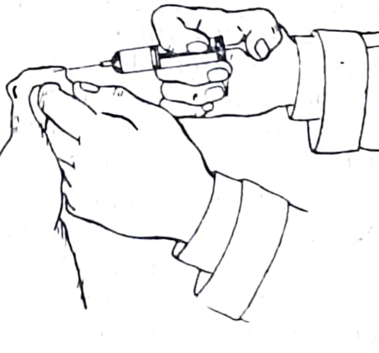


Fig. 488. — Inoculare în pielea metatarsului la cobaiul imobilizat într-un cilindru de carton.

Se retrage brusc acul şi se aplică o picătură de colodiu.

Inocularea în camera anterioară a ochiului (folosită în oreion). Se recomandă narcotizarea animalului cu eter. Cu ajutorul mînerului plat al unui bisturiu se exorbitează ochiul (mult mai greu ca la iepure) şi se prinde între indexul şi policele mîinii stîngi a experimentatorului. Se introduce un ac de seringă extrem de fin (diametru 4/10 mm), oblic, în cornee, la cîţiva milimetri de centrul ochiului. În momentul în care acul a pătruns în camera anterioară, apare la capătul său o picătură din lichidul umorii apoase. Se lasă să se scurgă 3—4 picături, se adaptează seringa la ac şi se injectează o cantitate egală de emulsie virulentă. Se retrage brusc acul şi în acelaşi moment ajutorul aplică la locul inoculării, rapid, vîrful fierbinte al unei pipete Pasteur, închise, după care se reintroduce ochiul în orbită.

Inocularea intracerebrală la cobai se execută întocmai ca la iepure; cantitatea de lichid care se introduce intracranian este însă mai mică : 0,2 ml.

Inocularea intravenoasă este o operaţie mult mai dificilă decît la iepure. Se realizează de obicei în vena *safenă externă* (în special la animalele cu pielea albă) sau în *vena jugulară*.

Inocularea în vena safenă se execută astfel : se imobilizează animalul cu abdomenul în jos în tava de operaţie, prin întinderea şi legarea membrelor. În regiunea coapsei se epilează părul şi vena apare prin transparenţa pielii. Se aseptizează regiunea şi apoi se practică o mică incizie în unghi care permite, prin răsturnarea lamboului triunghiular de piele realizat, denudarea venei. Cu un ac fin de seringă se injectează în torentul circulator cantitatea voită din suspensia virulentă.

Unii autori recomandă înlocuirea inoculării intravenoase cu *inocularea intracardiacă*; în ce ne priveşte, preferăm inocularea în vena safenă.

De reţinut că la cobai nu se vor introduce în torentul circulator niciodată mai mult de 5 ml.

Tehnici uzuale de recoltare a materialului de studiu

Ca şi în cazul experimentaţiei pe iepure, vom descrie numai tehnicile de recoltare a produselor necesare diagnosticului de laborator pentru diversele inframicrobioze umane.

Sîngele pentru frotiuri se prelevează din ureche, prin crestarea cu foarfeca a marginii urechii pe o distanţă de cîţiva milimetri.

Pentru obţinerea unei cantităţi mai mari de sînge necesar cercetărilor serologice, se va practica o *puncţie cardiacă*, după o tehnică asemănătoare cu cea descrisă la iepure.

Locul de elecţie al puncţiei cardiace la cobai se găseşte la 1 cm deasupra vîrfului unghiului pe care-l formează apendicele xifoid cu ultimul cartilaj costal articulat cu sternul.

Acului i se va da o înclinaţie de jos în sus, dinainte înapoi şi uşor înăuntru către linia mediană. În felul acesta, pătrunzînd 1,5 cm, vîrful acului se va găsi în ventriculul stîng; sîngele care este aruncat în sacade prin ac probează aceasta. Se adaptează seringa şi se aspiră încet cantitatea de sînge necesitată, avînd grijă să nu se depăşească cantitatea de 10 ml. Se retrage brusc acul şi se tamponează cu tinctură de iod. Operaţia se poate repeta la interval de cîteva zile.

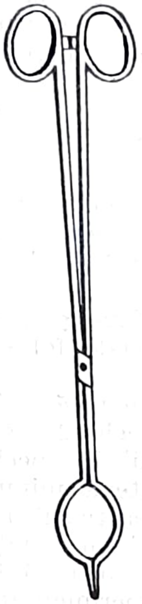


Fig. 489. — Pensă de prins şobolanii.

Extirparea testiculului, folosită pentru diagnosticul unor rickettsioze, se execută simplu, după o tehnică propusă de P. F. Zdrodovski, pe animalul sacrificat şi fixat în tava de necropsie cu abdomenul în sus.

După dezinfectarea riguroasă cu alcool şi tinctură de iod a regiunii abdominale şi a bazei coapselor, se fac, cu o foarfecă bine ascuţită, 2 incizii ale pielii, pornind de la ombilic către baza coapselor. Se obţine astfel un triunghi de piele cu vîrful la ombilic; testiculele se află situate la baza acestui triunghi.

Cu aceeaşi foarfecă se continuă median secţionarea pielii, de la vîrful triunghiului către torace. După ce această ultimă secţiune este continuată în dreapta şi stînga către axile, cele 2 lambouri superioare se disecă uşor, descoperindu-se muşchii abdominali. Cu o pensă Kocher se apucă vîrful triunghiului de piele rămas pe loc şi se trage în jos. Testiculele învelite în tunicile vaginale apar evidente.

Dacă descoperirea gonadelor nu reuşeşte dintr-o dată, ele se eliberează din ţesutul celular subcutanat printr-o ușoară mișcare, cu vîrful foarfecei închise.

Cu o pensă fină chirurgicală testiculele sînt apoi apucate, desprinse cu foarfeca și introduse într-o cutie Petri sterilă.

Prelevarea creierului se va face întocmai ca la iepure; dacă este vorba de un cobai tînăr se va folosi, în loc de costotom, o foarfecă puternică bine ascuțită.

INOCULAREA LA ȘOBOLAN[1]

Fiind un animal mai greu de manipulat, se recomandă apucarea lui cu o pensă specială (fig. 489) astfel ca globul pensei să cuprindă gîtul animalului; totodată el va fi ținut întins de coadă.

Inoculările subcutanate, musculare și peritoneale se fac după tehnicile uzuale folosite și la cobai.

Inocularea intravenoasă se practică la șobolan în una din cele 2 vene caudale vizibile lateral la baza cozii, în special după menținerea cozii timp de cîteva minute în apă caldă. Se va folosi un ac foarte subțire. Inocularea se practică introducînd cu atenție acul în vas, avînd grijă ca baza cozii să fie bine fixată pe indexul stîng al experimentatorului. Pentru creșterea turgescenței venei, ajutorul va face o ușoară presiune la baza cozii, presiune care, după pătrunderea acului în venă, se întrerupe. După introducerea suspensiei virulente (maximum 1 ml) acul se retrage lent.

Inocularea intracerebrală se face la șobolanul tînăr, fără trepanație prealabilă, acul de seringă putînd traversa fără mari dificultăți tăblia osoasă; la șobolanul bătrîn, trepanația este necesară. Locul de elecție al inoculării este situat la cîțiva milimetri în afara liniei mediane, la jumătatea distanței dintre protuberanța occipitală superioară și cea orbitară externă.

Doza de inoculare subdurală nu poate depăși la șobolan 0,1 ml. Ca și în cazul inoculării la alte specii animale, asepsia trebuie să fie riguroasă.

Tehnici uzuale de recoltare a materialului de studiu

Sîngele pentru frotiuri se recoltează prin secționarea vîrfului cozii cu ajutorul unei foarfece bine ascuțite, după menținerea cozii cîteva secunde în apă fierbinte și evitîndu-se comprimarea ei. Se va avea grijă să se șteargă urmele de apă de pe coadă, pentru a se evita hemolizarea.

O cantitate mai mare de sînge de la șobolan se poate obține, de asemenea, prin tăierea vîrfului cozii și recoltarea picăturilor de sînge într-o eprubetă; se pot astfel recolta 0,5 ml.

Prin puncționarea *sinusului cavernos* se poate obține comod 1 ml sînge. Capul animalului fiind bine imobilizat de ajutor, cu o pipetă Pasteur, moderat efilată, sau cu un ac de seringă, se pătrunde între globul ocular și peretele osos la nivelul unghiului posterior al orbitei. Introducînd pipeta sau acul 1 cm, se perforează sinusul cavernos după care sîngele pătrunde în pipetă.

Prelevarea creierului este mai simplă ca la cobai. După fixarea animalului în tava de necropsie, se badijonează cu alcool părul și pielea capului animalului, după care, cu ajutorul unei foarfece și al unei pense chirurgicale, aceasta este degajată larg. Se badijonează cu tinctură de iod calota. Cu o foarfecă mijlocie se face o incizie transversală între cele două orbite, o a doua transversală în dreptul cefei, apoi incizii laterale, unind marginile secțiilor transversale. Se ridică cu pensa calota și creierul apare în totalitatea lui. Se secționează meningele cu ajutorul unei foarfece fine și se prelevează un mic fragment din partea anterioară a encefalului pentru controlul bacteriologic.

Se degajează encefalul și cu ajutorul pensei și foarfecei fine, se scoate și se transportă într-o cutie Petri sterilă, după care, cu aceeași foarfecă, se împarte în trei fragmente. Pentru aceasta, se fac două secțiuni transversale: o primă secțiune la nivelul chiasmei și o a doua la nivelul pedunculilor cerebrali. Fragmentele anterioare și posterioare se folosesc pentru inoculări imediate, sau se conservă, iar fragmentul median se trece în amestecul fixator.

INOCULAREA LA ȘOARECE

Experimentarea pe șoarece este foarte mult folosită pentru diagnosticul a numeroase viroze.

În afară de șoarecele adult, este mult utilizat șoarecele nou-născut, „șoarecele de lapte'' (în special pentru izolarea virusurilor *Coxsackie*).

În ce privește experimentarea pe *șoarecele adult*, se recomandă folosirea animalelor cu o greutate medie de 15–20 g.

Astăzi, în majoritatea laboratoarelor de specialitate, se folosesc șoareci selecționați. Se cunosc mai multe linii pure, dintre care unele sînt mai sensibile la acțiunea virusurilor și mai rezistente față de anumiți germeni microbieni, fapt care face recomandabilă folosirea lor în laboratoarele de diagnostic inframicrobian.

---

[1] Pentru izolări de virusuri se recomandă folosirea animalelor tinere, greutatea medie 130 g.

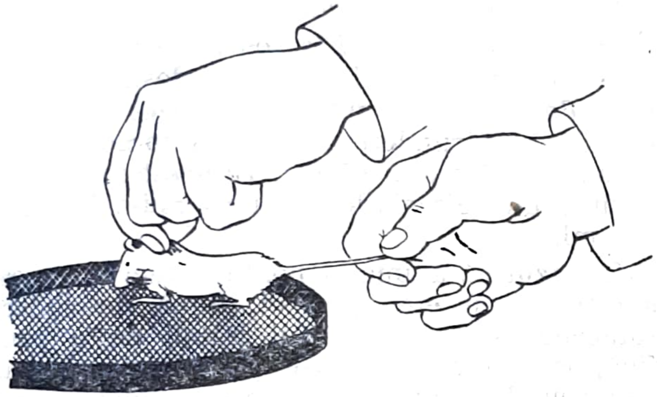


Fig. 490. — Apucarea șoarecelui.

Astfel sînt liniile R.A.P. și SW (Suisse) din varietatea albinos și D.B.A.O. bej și negru, din varietatea pigmentată.

Există totodată și anumite linii genetic pure de șoareci, mai sensibile pentru anumite virusuri. Astfel, spre exemplu, liniile Akr și C. 58 sînt intens leucemigene, linia Decin este extrem de sensibilă la acțiunea patogenă a virusurilor encefalitice etc.

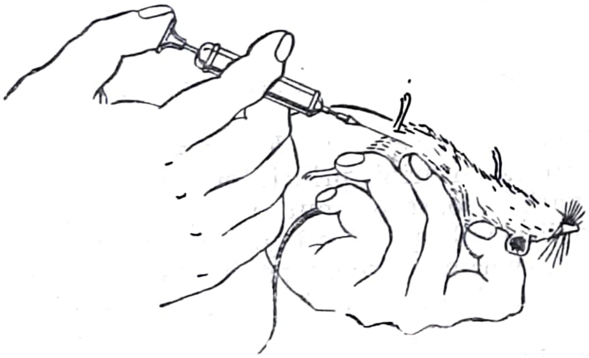


Fig. 491. — Inoculare intraperitoneală la șoarece.

Inocularea intraperitoneală. Se prinde animalul cu mîna dreaptă de coadă, iar cu policele și indexul mîinii stîngi, pielea cefei (este recomandabil ca animalul să fie așezat pe o sită metalică, de care se agață cu ghearele și poate fi astfel mult mai ușor apucat) (fig. 490).

Într-un al doilea timp se prinde coada între degetul mic și palma mîinii stîngi, iar cu inelarul se imobilizează membrul inferior stîng al animalului. Se ține animalul într-o poziție ușor înclinată, cu capul în jos (fig. 491). Inocularea se practică în jumătatea inferioară a abdomenului, în afara liniei mediane, după aceeași tehnică ca la celelalte animale de laborator.

Cantitatea de emulsie virulentă inoculată pe această cale nu trebuie să depășească 1 ml.

Inoculările subcutanate și intramusculare se practică în regiunea coapsei, iar inocularea intravenoasă, în vena cozii, după același sistem ca la șobolan.

Inocularea intranazală, foarte mult folosită în infecția gripală, se poate face foarte comod la șoarece sub anestezie cu eter.

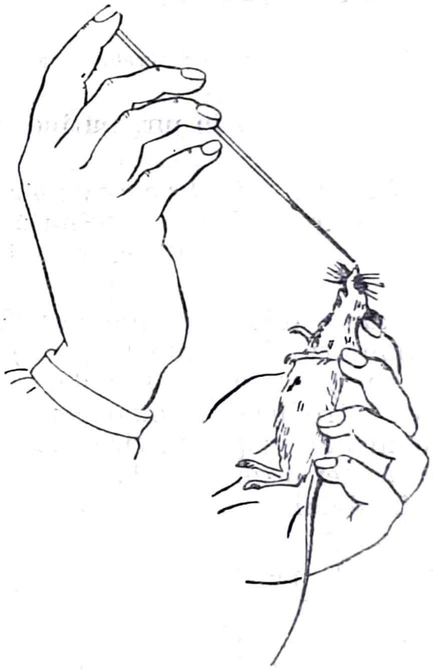


Fig. 492. — Inoculare intranazală la șoarece.

Animalul va fi adormit cu ajutorul unui tampon cu eter, sub un bocal sau sub o pîlnie de sticlă al cărei orificiu a fost închis cu vată (se recomandă îmbibarea bogată cu eter a tamponului, pentru obținerea unei narcoze rapide). După ce animalul este adormit, este scos din bocal, prins cu policele și indexul stîng de pielea cefii și ținut în poziție verticală. Cu ajutorul unei pipete Pasteur, sau cu ajutorul unei seringi, ținută cu mîna dreaptă, experimentatorul picură 1—2 picături în dreptul fiecărei nări (fig. 492). Animalul respiră liniștit, aspirînd picăturile virulente, care pătrund astfel în tractul respirator.

Narcoza trebuie să fie bună, deoarece în caz contrar animalul, în loc să aspire materialul infecțios, îl împroașcă în jur, putînd infecta pe experimentator.

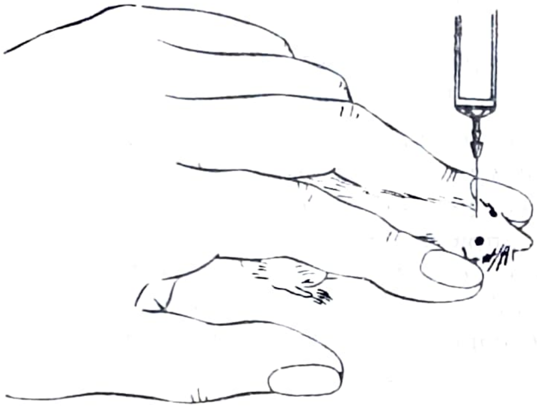


Fig. 493. — Inoculare intracerebrală la șoarece.

Inocularea intracerebrală se practică la șoarece după o tehnică similară, dar mult mai simplă decît cea descrisă pentru șobolan.

Se recomandă folosirea unor ace fine (0,4—0,5 mm diametru și 15 mm lungime) și a unei seringi de tip Barthélemy sau de tuberculină, care permit introducerea comodă a unei cantități foarte mici de suspensie virulentă (0,03 ml); depășirea acestei doze duce la moartea instantanee a animalului.

Pentru inoculare, animalul va fi imobilizat cu fața ventrală pe masa de lucru cu indexul și mediusul stîng, care vor apăsa pe bosele occipitale înapoia urechilor, podul palmei acoperind corpul animalului, în timp ce coada este ținută de inelarul și degetul mic al aceleiași mîini. Inocularea se practică într-un punct situat lateral, în afara liniei mediane, la jumătatea distanței dintre occiput și ochi, după aseptizarea regiunii cu tinctură de iod (fig. 493). Trebuie avut grijă ca acul să nu pătrundă mai mult de 3—4 mm, mai ales că perforarea craniului se face foarte ușor. Pentru aceasta, se pot folosi ace speciale cu opritoare.

Introducerea suspensiei virulente trebuie făcută încet. După retragerea bruscă a acului, se badijonează locul inoculării cu tinctură de iod sau alcool.

Tehnici uzuale de recoltare a materialului de studiu

Sîngele pentru frotiuri se recoltează prin secționarea vîrfului cozii. O cantitate mai mare poate fi obținută prin puncționarea inimii la animalul viu sau sacrificat.

Puncționarea inimii la șoarecele viu se poate face cu oarecare îndemînare, folosindu-se tehnica descrisă pentru șobolan. Deosebire face faptul că pătrunderea acului în torace nu trebuie să depășească 0,5 cm. În acest mod se pot obține, fără riscul de a omorî animalul, 03—0,5 ml.

În cazul că animalul poate fi sacrificat, este anesteziat cu eter și apoi, după deschiderea toracelui, se apucă vîrful inimii cu o pensă fină, iar cu acul de seringă se puncționează ventriculul stîng, obținîndu-se comod o cantitate de 1 ml sînge.

Scoaterea encefalului. Cu ajutorul unei foarfece fine, se face, după îndepărtarea pielii capului, o incizie a tăbliei osoase între cele două orbite, apoi, cu aceeași foarfecă, se secționează cu grijă calota laterală într-o parte și alta, pînă la marginea occipitală. Se dă peste cap calota osoasă și creierul apare în totalitate. Secționarea lui se face după același sistem ca la șobolan.

INOCULAREA LA ȘOARECELE PUI

Inocularea subcutanată. Ajutorul apucă cu grijă, prin intermediul unei bucăți de vată [1], șoarecele pui și îl ține între indexul și policele drept și stîng, cu fața ventrală în jos. Experimentatorul pătrunde sub pielea regiunii lombare cu vîrful unui ac fin dispus cu bizoul în sus, pe care îl dirijează apoi pînă în regiunea dorsală între omoplați, unde injectează încet suspensia virulentă în cantitate de 0,04 ml.

Retrage brusc acul și cu un tampon de vată face o ușoară presiune la locul inoculării, îndepărtînd eventualele urme ale emulsiei.

---

[1] Această precauție este necesară deoarece s-a constatat că procentul cel mai mare de șoareci pui devorați de mama respectivă, îl dau animalele ce au fost apucate direct de cercetători, fără un material intermediar.

T. A. Borodina recomandă ungerea puiului inoculat cu urina sau secreția vaginală a mamei. În acest scop se ține nou-născutul de pielea spatelui cu o pensă și se freacă de cîteva ori de abdomenul mamei.

După inoculare, animalul este lăsat cîteva minute în afara borcanului şi apoi aşezat cu grijă lîngă mama sa.

Inocularea intraperitoneală se execută fără prea multe precauţii. Se pătrunde cu un ac fin în regiunea subombilicală şi se injectează maximum 0,10 ml.

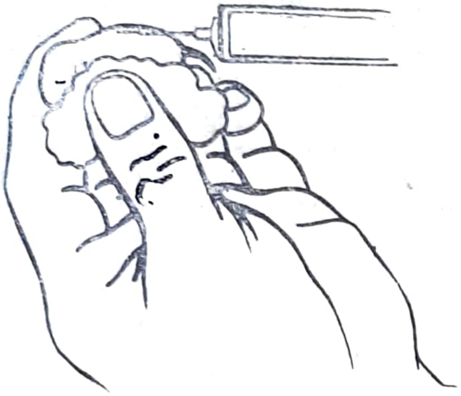


Fig. 494. — Inoculare interscapulară la şoarecele pui.

Se va avea grijă ca după inoculare excesul de emulsie care eventual s-ar găsi la locul inoculării să fie îndepărtat; în caz contrar, acest element poate reprezenta o cauză care atrage devorarea animalului de către mama respectivă.

Inocularea cerebrală trebuie făcută cu foarte mare precauţie, folosindu-se un ac scurt, extrem de fin. Se inoculează 0,01 ml din suspensia virulentă. Animalul suportă bine inocularea, datorită elasticităţii ţesuturilor sale.

Necropsia şoarecelui de lapte se face de cele mai multe ori pentru prelevarea materialului infecţios necesar pentru treceri viitoare. Cum în realitate în marea majoritate a cazurilor experimentarea pe acest animal se face cu virusuri *Coxsackie*, virusuri în special miotrope, se va recolta masa musculară în totalitate.

Pentru aceasta se fixează animalul cu faţa dorsală pe o plută, cu ace de gămălie, şi apoi cu ajutorul unei foarfece fine, se incizează median pielea pe abdomen şi torace. Se disecă cu atenţie şi se desface ţesutul subcutanat, separînd carcasa de învelişul tegumentar. Se deschide abdomenul şi se îndepărtează viscerele, ca şi organele toracice, după care carcasa, împreună cu capul, se conservă în glicerină la gheţar. Pentru studii microscopice, fragmente de muşchi, uneori şi creierul, se pun în amestecul fixator.

INOCULAREA LA ŞOBOLANUL DE BUMBAC ŞI HAMSTER

Inocularea, prelevarea diferitelor produse şi necropsierea se fac după tehnicile descrise pentru şobolanul alb.

De reţinut pentru şobolanul de bumbac că — datorită fragilităţii cozii sale — animalul va trebui apucat cu o pensă plată de pielea spatelui, şi niciodată de coadă. Cît priveşte hamsterul, acesta va trebui apucat de pielea cefii, extrem de laxă, cu mîna protejată de o mănuşă de piele; înainte de a fi apucat pentru experimentare, animalul va fi trezit din somn (de asemenea pentru evitarea muşcăturilor).

INOCULAREA LA GĂINĂ

În mod obişnuit, găina este folosită ca furnizoare de globule roşii pentru reacţia de hemaglutinare şi pentru prepararea unor seruri imune.

Inocularea subcutanată se practică în regiunea laterală a gîtului. Ajutorul imobilizează pasărea pe o masă de laborator, ţinînd cu una din mîini corpul găinii, iar cu cealaltă capul.

Acul seringii va fi dirijat înspre baza gîtului pasării.

Se pot injecta pînă la 40 ml lichid. Inocularea se va face totdeauna după epenare şi aseptizarea regiunii cu tinctură de iod.

Inocularea intramusculară se practică în masa muşchilor pectorali. Se recomandă folosirea unui ac subţire, dată fiind bogata vascularizare a acestui muşchi.

Se poate injecta 6—8 ml suspensie.

Inocularea intraperitoneală. Ajutorul ţine pasărea cu abdomenul în sus, imobilizînd-o de aripi şi picioare. Se depenează o porţiune din abdomen cuprinsă între cloacă şi vîrful sternului, după care pielea se aseptizează cu tinctură de iod.

Experimentatorul introduce perpendicular acul seringii într-un punct situat pe linie mediană, la mijlocul distanţei dintre vîrful sternului şi cloacă şi, după ce străbate peretele abdominal, injectează încet cantitatea de suspensie virulentă dorită (se pot injecta pînă la 50 ml lichid).

După inoculare se retrage brusc acul și se badijonează locul de injecție cu tinctură de iod.

Inocularea intravenoasă, se practică în mod obișnuit în vena humerală, deși ea se poate efectua și în vena posterioară a piciorului.

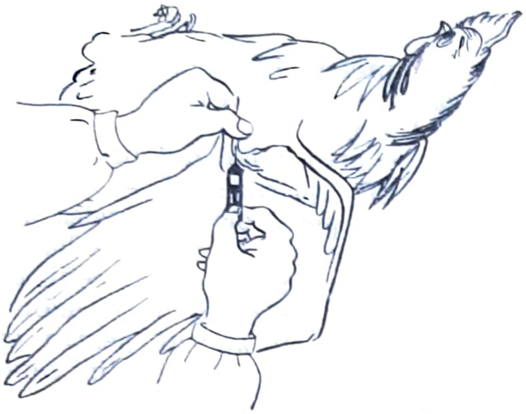


Fig. 495. — Inoculare intravenoasă la găină.

Inocularea în vena humerală se face astfel:

Ajutorul imobilizează pasărea cu una din aripi răsturnată. În acest fel (după epenare), vena humerală devine perfect vizibilă sub pielea feței inferioare a aripii, încrucișînd fața anterioară a articulației humero-cubitale.

După aseptizarea tegumentară cu tinctură de iod, ajutorul cu policele și indexul mîinii cu care ține aripa, face stază la nivelul axilei, iar experimentatorul introduce acul seringii în doi timpi: într-un prim timp perforează pielea și în al doilea pătrunde în venă.

Inocularea se face lent. Se pot injecta pînă la 10 ml lichid.

Tehnici uzuale de recoltare a materialului de studiu

Sîngele pentru frotiuri se obține cel mai comod din creastă. Se comprimă creasta între police și index și apoi, cu o foarfecă ascuțită, se face o mică incizie a marginii crestei. După prelevare, este recomandabilă cauterizarea plăgii cu o spatulă încinsă la flacără.

Cantități mai mari de sînge se pot obține prin puncție venoasă (4—5 ml din vena humerală, 2—3 ml din vena posterioară a labei) sau prin puncție cardiacă (10—20 ml). Sîngerarea totală se practică prin puncționarea carotidei.

Puncția cardiacă se efectuează astfel:

Găina, nemîncată de 24—36 de ore, este așezată pe masa de experiență cu fața ventrală în sus (se recomandă plasarea animalului la colțul mesei). Ajutorul așezat la stînga experimentatorului, fixează cu mîna sa stîngă corpul pasărei și aripile aduse pe abdomen, iar cu mîna dreaptă realizează pe marginea mesei hiperextensia gîtului astfel încît acesta să facă cu corpul găinii un unghi drept. După ce îndepărtează penele din regiunea interclaviculară, deasupra sternului, și aseptizează pielea cu tinctură de iod, experimentatorul introduce încet un ac de seringă de 5 cm cu bizoul scurt orizontal, median, între clavicule, paralel cu axul esofagului și traheei, la cîțiva milimetri sub fața posterioară a sternului (fig. 496).

Înaintînd 3—4 cm, vîrful acului pătrunde în inimă, în ventriculul drept, iar sîngele umple repede seringa. În acest mod se pot extrage 10—20 ml sînge.

Puncția carotidiană se face după tehnica următoare:

Se fixează găina, care nu a fost hrănită 12—24 de ore, cu fața dorsală pe masa de contenție și, sub narcoză cu eter, se face o incizie longitudinală de 8 cm a pielii gîtului, după îndepărtarea prealabilă a penelor, badijonarea tegumentului cu tinctură de iod și izolarea cu un cîmp operator fixat cu pense Péan la capetele inciziei.

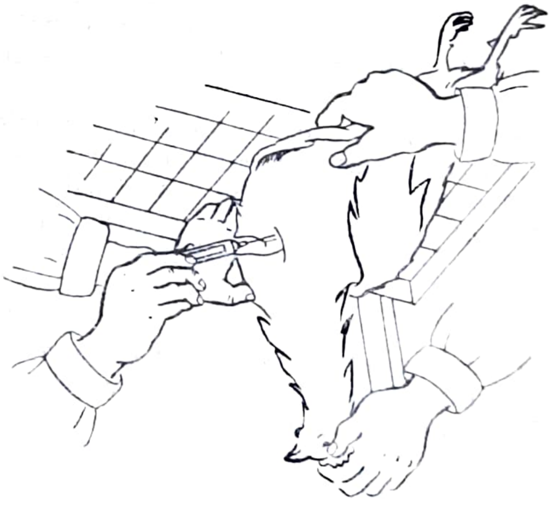


Fig. 496. — Tehnica puncției cardiace la găină.

După depărtarea marginilor plăgii, se incizează pe linia centrală fascia și mușchiul, după care, cu ajutorul unei sonde canelate, desfacem planurile profunde, pînă cînd apar evidente carotidele, 2 vase paralele care pulsează puternic. Degajăm cu sonda canelată una din artere, o tragem în afară şi o izolăm cu ajutorul unui tifon steril.

Cu ajutorul unui fir de mătase se face o ligatură puternică către extremitatea cefalică, iar în extremitatea opusă comprimăm cu o pensă hemostatică.

Sîngerarea propriu-zisă, se poate face, fie cu ajutorul unei canule cu olivă (tip Carrel), fie cu un ac gros, montate la un tub de cauciuc.

În cazul utilizării acului, acesta se introduce în artera umflată, pătrunzînd către baza gîtului. În cazul folosirii canulei procedăm astfel: în artera umflată facem, cu ajutorul unei foarfece fine, o incizie longitudinală de 0,5 cm şi introducem canula, pe care o fixăm la arteră cu ajutorul unui alt fir de mătase. După introducerea acului sau canulei, desfacem pensa hemostatică şi recoltăm în vase sterile cantitatea de sînge necesitată.

În caz că nu dorim să facem o sîngerare totală, după recoltarea cantităţii de sînge necesară se face o ligatură suplimentară sub incizie, sau sub locul de puncţie, după care se scoate canula sau acul şi se suturează pielea.

După 1—2 săptămîni, pasărea va putea fi din nou şi definitiv sîngerată, folosind cealaltă carotidă.

DISTRUGEREA CADAVRELOR ANIMALELOR INFECTATE

Distrugerea cadavrelor de animale infectate experimental, necropsiate sau nu, este obligatorie.

Aceasta se realizează cel mai comod în *crematorii* speciale, în care carbonizarea animalului se face într-un timp care variază de la 10—30 de minute, după tipul de crematoriu folosit.

În lipsa unui crematoriu special, animalele vor fi introduse în *gropi* săpate la un metru adîncime în pămînt şi apoi acoperite cu lapte de var, proaspăt preparat.

INOCULAREA ÎN OUL EMBRIONAT DE GĂINĂ

Dintre metodele de izolare şi cultivare a inframicrobilor, una dintre cele mai răspîndite este aceea care foloseşte oul de găină embrionat.

Metoda realizată de Woodruff şi Goodpasture în 1931 a devenit astăzi — bineînţeles cu numeroasele modificări aduse — o metodă simplă, curentă, accesibilă tuturor laboratoarelor de virusologie, dînd rezultate excelente.

Considerăm util a reda cîteva amănunte cu privire la materialele şi metoda de lucru.

Ouăle întrebuinţate trebuie să fie fecundate şi ouate de maximum 8—10 zile. Se preferă ouă cu coaja albă, provenite de la găini *Leghorn*, procurate, pe cît posibil, de la aceeaşi sursă.

Pentru a obţine bune rezultate ouăle vor fi conservate în perioada de timp ce se scurge de la ouare la incubare, la întuneric şi la o temperatură constantă, cuprinsă între +5° şi +10°.

Înainte de a fi introduse în incubator, ouăle foarte murdare vor fi spălate cu un tampon de vată îmbibat în apă distilată sterilă; se vor prefera însă ouă curate, care nu vor fi spălate. Cu un creion obişnuit se va înscrie pe coajă data punerii la incubat şi în acelaşi timp se va împărţi suprafaţa oului în 4 sectoare longitudinale, delimitînd fiecare un sfert din suprafaţă; aceste sectoare vor fi marcate cu literele A, B, C şi D.

Incubarea ouălor se realizează de preferinţă în clocitori speciale, cu temperatura, umiditatea şi aeraţia reglabile automat (+39°, umiditate 50—60%).

În laboratoarele în care nu există astfel de incubatoare se vor folosi, fie termostate obişnuite reglabile, în care se va menţine umiditatea necesară prin vase cu apă, iar aerisirea se va face de două ori pe zi prin deschiderea uşii, fie termostate obişnuite, modificate pentru acest scop.

Ouăle vor fi menţinute pe suporturi speciale de metal, lemn sau carton, în care se realizează nişte orificii, unele ovale (diametru 3,8 cm × 5 cm) şi altele rotunde (diametrul 4 cm), care să permită menţinerea comodă a ouălor.

Ouăle vor fi aşezate în incubator în poziţie orizontală. Se va avea grijă ca ele să fie zilnic întoarse cu 90°, urmînd ordinea alfabetică a celor 4 sectoare, A,B,C şi D.

După 4 zile de la introducerea în incubator, se face mirajul ouălor — examinarea prin transluminaţie — pentru a se stabili prezenţa şi dezvoltarea normală a embrionului.

Un control comod al embrionului se poate practica la întuneric cu ajutorul unui ovoscop simplu, constituit dintr-o cutie de lemn care prezintă în capac un orificiu oval (dimensiunea 3,8 × 5 cm), cu marginile îmbrăcate în pluş sau catifea. În interiorul cutiei de lemn se montează un bec de 100 w. Oul plasat la nivelul orificiului va fi perfect transluminat, iar pîsla sau catifeaua aplicată face imposibilă străbaterea razelor de lumină care ar putea jena ochii experimentatorului.

Prin transluminare se pot bine identifica embrionul (o mică zonă mai opacă roșiatică), vasele alantoidiene, ca și camera de aer.

După eliminarea ouălor neembrionate, ca și a celor embrionate și moarte în această perioadă (la ovoscop, un aspect caracterizat prin o zonă opacă înconjurată de un cerc roșu), ouăle rămase în incubator vor fi zilnic examinate. Se vor reține în experimentare numai acele care prezintă embrionii bine dezvoltați, cu viabilitate evidentă (mișcări vii, permanente).

Inocularea ouălor se va face după o incubare care variază cu inframicrobul studiat; unele virusuri se dezvoltă mai bine pe embrioni foarte tineri, altele pe embrioni mai vîrstnici.

Vîrsta embrionului folosit este în funcție și de calea de inoculare. Astfel, pentru inocularea intravitelină se folosesc ouă de 5—7 zile, pentru calea intraamniotică, de 6—10 zile, pentru calea intraalantoidiană 9—11 zile, pentru inocularea pe membrana corio-alantoidiană embrioni de 10—14 zile. Vîrsta embrionului trebuie să fie aleasă și după timpul necesar de cultivare a fiecărui virus în parte pe respectiva formațiune embrionară. Astfel, virusul gripal se dezvoltă în cavitatea amniotică în 48 de ore, virusul urlian în cavitatea alantoidiană sau amniotică în 6—7 zile etc.

Înainte de a trece la inocularea ouălor, la examinarea lor la ovoscop se vor nota atent, cu un creion obișnuit, pe coajă, limita camerei de aer, poziția embrionului, poziția vaselor (pentru a nu le leza în inocularea intraalantoidiană), poziția capului embrionului (pentru inocularea intraamniotică).

Inocularea unui virus în oul embrionat se poate face pe mai multe căi, pentru fiecare cale de inoculare existînd descrise multiple metode și variante. Dintre variantele imaginate, în scop diagnostic se folosesc în mod curent următoarele căi de inoculare:

a) pe membrana corio-alantoidiană;
b) în cavitatea alantoidiană;
c) în cavitatea amniotică;
d) în cavitatea vitelină.

Diferitele căi de inoculare sînt practicate de experimentator după o prealabilă analiză a virusului cercetat. Aceasta este o problemă simplă atunci cînd se inoculează un virus cunoscut, cu proprietăți bine stabilite; este mai dificilă alegerea căii de inoculare pentru izolarea și identificarea unui inframicrob necunoscut dintr-un produs patogen trimis pentru diagnostic. În acest din urmă caz cercetătorul va trebui să analizeze datele primite și, pe baza diagnosticului de prezumție, să încerce mai multe variante de inoculare.

Pentru o mai bună orientare dăm un tabel cu calea de elecție pentru inocularea în oul embrionat a diferiților inframicrobi (tabelul 155).

TABELUL 155

Căi de inoculare de elecție pentru izolarea unor inframicrobi patogeni pentru om, în oul de găină embrionat

Inframicrobioza (în ordinea alfabetică)	Membrana corio-alantoidă	Cavitatea alantoidiană	Cavitatea amniotică	Cavitatea vitelină
Encefalita japoneză	+			
Encefalita St. Louis	+			
Febra galbenă	+			+
Gripa	±	±	++	
Herpesul	+			
Kerato-conjunctivita epidemică		+		
Limfogranulomatoza venerică	+	+		++
Ornitoza-psittacoza	±	±	±	++
Parotidita epidemică		±	++	
Pseudopesta aviară (Newcastle)	+	+	++	
Tifosul exantematic, pulmonar etc.				+
Trahomul				+
Vaccina	+			
Variola	+			

În practica uzuală, inocularea în oul embrionat trebuie făcută cu cea mai mare atenție, luîndu-se totdeauna toate măsurile de asepsie pentru a se preîntîmpina infectarea microbiană a embrionilor.

Tot în scopul evitării infectării microbiene a embrionilor — fapt care compromite total încercările de izolare și identificare de germeni inframicrobieni — majoritatea produselor care vor fi inoculate în ou pe diferite căi vor trebui tratate cu antibiotice (aceasta bineînțeles numai cînd sterilitatea este cît de puțin discutabilă).

În practica uzuală antibioticele vor fi folosite în doze care să nu aducă prejudicii, nici inframicrobilor și nici embrionilor. Pentru aceasta se vor adăuga 1 000 u. penicilină și 100 μg streptomicină, cu 15—30 de minute înainte de inoculare, pentru fiecare ml de suspensie virulentă centrifugată.

TEHNICA INOCULĂRII PROPRIU-ZISE ÎN OUL EMBRIONAT

Materialul necesar : — freză dentară electrică sau cu pedală, cu discuri de carborund (în lipsa acestui aparat se poate folosi o pilă de fiole ascuțită) ;

- suporturi pentru menținut oul în poziție verticală și orizontală. Este recomandabilă folosirea unor suporturi metalice de tablă, ușor sterilizabile, sau de placaj, cu orificiul rotund (pentru poziție verticală) sau oval (pentru poziție orizontală) ; în lipsa unui astfel de suport se poate folosi un pahar Berzelius, cu diametrul convenabil, în care se introduce vată ;
- 1 foarfece fin curb (oftalmologic) ;
- 2 foarfece fine drepte (oftalmologice) ;
- 2 pense fine de iris ;
- 1 ac de disociație ;
- 1 seringă de 1 ml ;
- ace de seringă fine cu bizou scurt ;
- tetină de cauciuc ;
- pipete Pasteur ;
- lamele de sticlă (24 × 24 mm) ;
- cutii Petri sterile ;
- amestec de parafină cu ceară 5 % ;
- tampoane de vată, tinctură de iod diluată, alcool 70°.

Produsul de inoculat poate consta fie dintr-un virus cunoscut (pentru treceri în serii sau pentru prepararea de antigene), fie dintr-un produs patogen, recoltat în vederea stabilirii diagnosticului, prin izolarea și identificarea germenului inframicrobian ce-l conține.

Suspensiile virulente se fac în apă distilată sau într-un diluant adecvat inframicrobului în cauză.

Diluția folosită, în cazul virusurilor cunoscute, va trebui să țină seama de titrul virusului respectiv ; atunci cînd însă se lucrează cu suspensii virulente, necunoscute, se vor întrebuința două diluții, și anume : 1/10 și 1/100.

Deși în practica uzuală se folosesc pentru fiecare cale de inoculare cîteva tehnici mai mult sau mai puțin apropiate, vom descrie pe cele mai convenabile și care, în experiența noastră, ne-au dat rezultatele cele mai bune pentru diagnosticul diferitelor afecțiuni virotice.

Inocularea pe membrana corioalantoidiană. Metoda clasică (Beveridge). Se folosesc ouă embrionate de 8—12 zile.

Se examinează oul la ovoscop și se marchează limita *camerei de aer* (printr-o linie), *poziția embrionului*, precum și *regiunea în care membrana corioalantoidiană este mai bine dezvoltată*, avînd grijă să se ocolească vasele alantoidiene.

Se așază oul orizontal pe suport și se aseptizează cochilia cu tinctură de iod diluată, în dreptul centrului camerei de aer, ca și în regiunea corespunzătoare membranei corioalantoidiene, unde vom practica deschiderea oului.

Cu ajutorul unei rondele de carborund, montată la freza dentară, se face o incizie a cochiliei, de forma unui triunghi echilateral cu latura de 1 cm ; o a doua incizie, mică, liniară, de 1—2 mm, se realizează în coajă, aproximativ în centrul camerei cu aer (fig. 497).

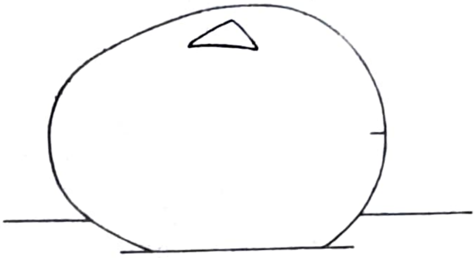


Fig. 497. — Incizie triunghiulară a cochiliei în vederea inoculării pe membrana corioalantoidiană.

Cu o pensă fină de iris se ridică triunghiul tăiat în cochilie și se depune într-o cutie Petri sterilă.

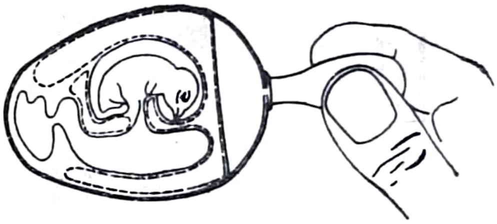


Fig. 498. — Aspirarea aerului din camera cu aer cu ajutorul unei tetine, în vederea deplasării acestuia.

Cu ajutorul unui ac de disociație se înțeapă cu atenție membrana proprie a oului, la nivelul ambelor orificii realizate, după care, cu ajutorul unei tetine de cauciuc, aplicate în dreptul orificiului din centrul camerei cu aer, se aspiră aerul din această cavitate (fig. 498).

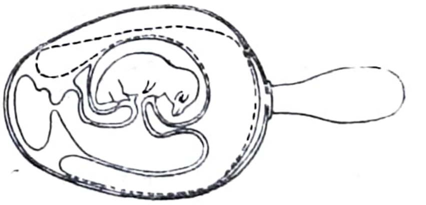


Fig. 499. — S-a format o nouă cameră de aer.

În urma acestei aspirații se realizează o „deplasare" a camerei de aer, în sensul că se produce o nouă cameră de aer deasupra embrionului, prin dezlipirea membranei corio-alantoidiene de membrana proprie a oului; în această nouă cameră, aerul pătrunde de la exterior prin orificiul făcut în membrana proprie a oului.

Se secționează cu atenție membrana proprie a oului în dreptul triunghiului și membrana corio-alantoidiană apare astfel evidentă.

Cu ajutorul unei seringi sau pipete Pasteur se picură pe suprafața membranei corio-alantoidiene cîteva picături din emulsia virulentă.

Se închide orificiul triunghiular cu ajutorul unei lamele de sticlă (sterilizată prin menținerea în alcool și flambare), după ce s-a aplicat pe marginea triunghiului un strat subțire din amestecul de parafină și ceară, topit; se închide apoi cu o picătură de parafină și orificiul de la nivelul camerei de aer.

Oul astfel inoculat este introdus în termostat, la o temperatură care variază după inframicrobul respectiv, și menținut 1—6 zile în poziție orizontală, fără a mai fi rotat.

În cazul practicării acestei tehnici de inoculare pe membrana corio-alantoidă se poate folosi pentru închiderea oului însuși căpăcelul triunghiular detașat din cochilie și care a fost depus după recoltarea sa într-o cutie Petri sterilă; aplicarea lui se va putea face numai dacă membrana proprie a oului nu s-a îndepărtat, în care caz nu ar mai exista un suport suficient [1]. După aplicarea triunghiului cochilier se întinde deasupra lui un strat foarte subțire de parafină topită.

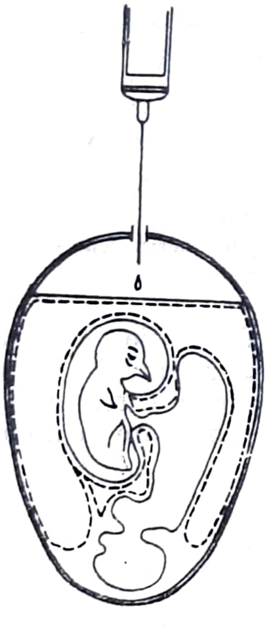


Fig. 500. — Inoculare în camera de aer.

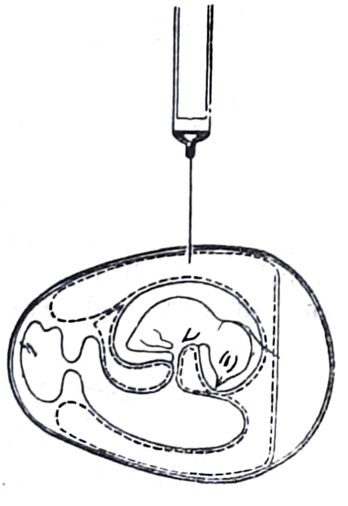


Fig. 501. — Inoculare în cavitatea alantoidiană.

Pentru închiderea oului s-a mai propus folosirea unui triunghi de celofan (sterilizat prin scufundare în apă clocotită și trecere succesivă într-un amestec de ovalbumină 10% filtrată, la care s-a adăugat și cloroform). Celofanul aderă foarte bine de cochilie, de care se fixează cu ajutorul amestecului de parafină și ceară topit și chiar fără intermediul acestuia.

O tehnică foarte simplă de inoculare pe membrana corio-alantoidiană a fost descrisă de I. Suhaci și colaboratorii. Se realizează în cochilie cu freza dentară un orificiu ovalar de 1—2 mm, deasupra embrionului și un orificiu similar în centrul camerei de aer.

Se înțeapă cu un ac membrana proprie a oului, la nivelul celor 2 orificii create, și apoi se aspiră aerul din camera de aer cu ajutorul unei tetine aplicate la orificiul realizat la acest nivel al oului. În acest fel se realizează o deplasare a camerei de aer.

Cu ajutorul unui ac fin de seringă se introduc prin orificiul superior (prin membrana proprie) cîteva picături virulente, care se răspîndesc pe suprafața membranei corioalantoidiene.

De curînd, Essen și Lembke au arătat că, datorită permeabilității membranei proprii a oului, este suficientă depunerea emulsiei virulente chiar pe această membrană. În acest scop se practică un mic orificiu în cochilie în dreptul camerei cu aer și cu ajutorul unei seringi înarmată cu un ac fin, se pătrunde în camera cu aer, unde se lasă 0,2 ml din emulsia virulentă (fig. 500).

Inocularea în cavitatea alantoidiană. Se folosesc de obicei ouă embrionate în vîrstă de 9—11 zile.

După ce s-a marcat la ovoscop un punct situat deasupra embrionului, și după aseptizare cu tinctură de iod diluată, se face o mică perforație punctiformă în cochilie, ocolindu-se vasele alantoidiene, oul fiind menținut în poziție orizontală.

Cu ajutorul unui ac fin cu bizoul scurt se pătrunde prin orificiul creat, traversînd membrana proprie a oului și membrana corio-alantoidiană pe o adîncime de 3—4 mm (fig. 501).

---

[1] În această variantă inocularea se face prin străpungerea membranei proprii.

Se injectează 0,1—0,2 ml emulsie virulentă, după care acul se retrage brusc și se aplică o picătură de parafină topită.

Inocularea în cavitatea amniotică. Tehnica Taylor-Chialvo. Se folosesc embrioni în vîrstă de 6—10 zile. Cu 24 de ore înainte de inoculare ouăle se vor menține în incubator în poziție verticală, cu camera de aer în sus.

Pentru inoculare se plasează oul în poziția verticală, fiind luminat puternic de un fascicul luminos care cade perpendicular pe axul mare al oului. După aseptizarea cu tinctură de iod, se face o fereastră triunghiulară sau dreptunghiulară, cu latura de 1,5 cm, în coaja camerei de aer.

Se depune pe membrana proprie o picătură de alcool, în scopul de a o face mai transparentă, după care aceasta se îndepărtează pe o porțiune de 1—2 cm, cu ajutorul unei pense fine.

Tot cu această pensă fină, se prinde membrana corioalantoidiană și sacul amniotic care se trage în sus, iar cu un ac fin se introduce în cavitatea amniotică 0,1—0,2 ml suspensie virulentă (fig. 502). Se retrage brusc acul, după care orificiul din cochilie se închide fie cu o lamelă de sticlă, fie cu celofan adeziv.

După inoculare oul va fi menținut în incubator în poziție verticală.

Tehnica clasică. Ca și în tehnica precedentă, se folosesc embrioni în vîrstă de 6—10 zile. Inocularea se practică menținînd în poziție orizontală, după marcarea la ovoscop a locului în care embrionul este mai apropiat de cochilie. Se face un mic orificiu în cochilia aseptizată și apoi, cu ajutorul unui ac cu bizoul scurt, introdus prin acest orificiu, se pătrunde prin membrana proprie a oului și membrana alantoidiană, pînă în momentul în care vîrful acului atinge embrionul (fig. 503) (aceasta se constată fie printr-o rezistență specială, fie, în cazul în care inocularea se face în oul transluminat, prin retragerea bruscă a embrionului).

Se injectează 0,1 ml din produsul patologic, se retrage brusc acul, iar orificiul se închide cu o picătură de parafină topită.

Inocularea în sacul vitelin. Se folosesc ouă embrionate în vîrstă de 5—7 zile. Se marchează la ovoscop locul în care embrionul este mai aproape de cochilie. Se aseptizează cu tinctură de iod coaja oului la nivelul centrului camerei de aer și cu freza dentară se realizează un mic orificiu, oul fiind menținut orizontal sau vertical. Cu un ac de 3—4 cm lungime, adaptat la seringa care conține suspensia virulentă, se pătrunde prin acest orificiu, dînd acului o înclinare de 45° și înaintînd în direcția opusă punctului care marchează pe coajă poziția embrionului. După ce acul a pătruns 3 cm, se inoculează 0,2—1 ml suspensie (fig. 504).

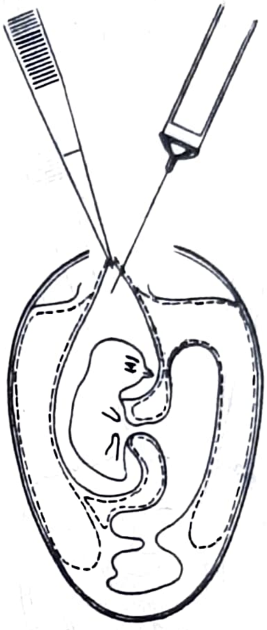


Fig. 502. — Tehnica Taylor-Chialvo pentru inoculare în cavitatea amniotică.

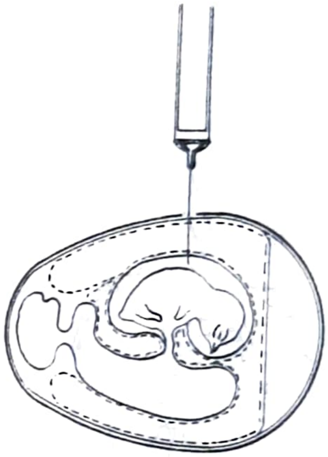


Fig. 503. — Inoculare în cavitatea amniotică (tehnica clasică)..

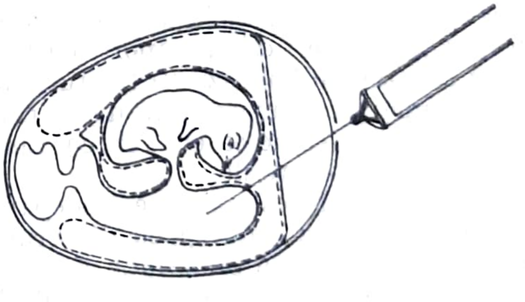


Fig. 504. — Inoculare în sacul vitelin.

Se retrage cu atenție acul și se parafinează orificiul din cochilie.

Prelevarea diferitelor componente ale oului embrionat

După un timp variabil de la inoculare, timp în funcție de inframicrobul cercetat sau de mișcările embrionului (aceasta în special în cazul cercetării unui virus necunoscut), se va proceda la prelevarea diferitelor părți ale oului embrionat inoculat.

În acest scop, oul va fi plasat în poziție verticală pentru 10—20 de ore la ghețar la +4° sau $1^1/_2$—2 ore la —30°. Se utilizează acest timp preparator pentru a evita deschiderea vaselor în timpul diferitelor manopere.

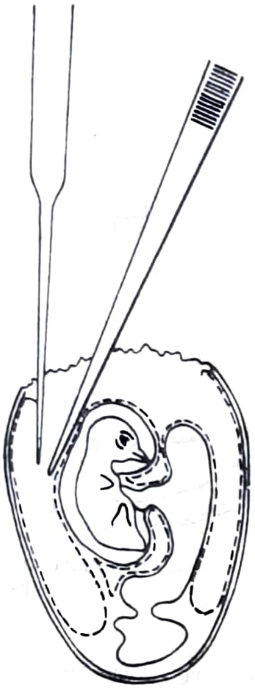


Fig. 505. — Tehnica recoltării lichidului alantoidian.

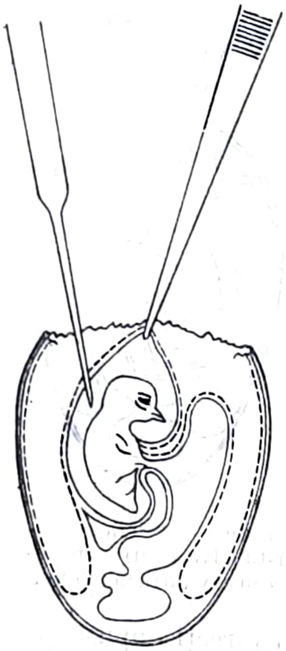


Fig. 506. — Tehnica recoltării lichidului amniotic.

După acest timp se trece la deschiderea oului.

Oul este plasat vertical în suport, cu camera de aer în sus. Se badijonează cu tinctură de iod coaja în jumătatea superioară, după care se decupează calota camerei cu aer cu ajutorul unei foarfece curbe sterile.

După eliminarea calotei, se îndepărtează membrana proprie a oului și cu ajutorul unei pipete Pasteur sau, de preferință, cu o pipetă cu bulă, se aspiră cantitatea necesară de *lichid alantoidian* (se pot obține în medie 5—8 ml), care se trec într-o eprubetă sterilă, după ce, în prealabil, s-au însămînțat cîteva picături în medii de cultură aerobe și anaerobe pentru controlul sterilității (fig. 505).

Lichidul alantoidian este clar, de nuanță gălbuie, uneori însă ușor tulbure.

După recoltarea lichidului alantoidian se extrage *lichidul amniotic*. Acesta se recoltează prin puncționarea sacului amniotic, fie pe loc, după apucarea lui cu ajutorul unei pense fine, fie după scoaterea întregului embrion și a anexelor sale, într-o cutie Petri sterilă (fig. 506).

Lichidul amniotic este clar, incolor. Poate fi obținut în cantitate de 1—3 ml. Ca și în cazul lichidului alantoidian, este obligatoriu controlul sterilității în medii aerobe și anaerobe.

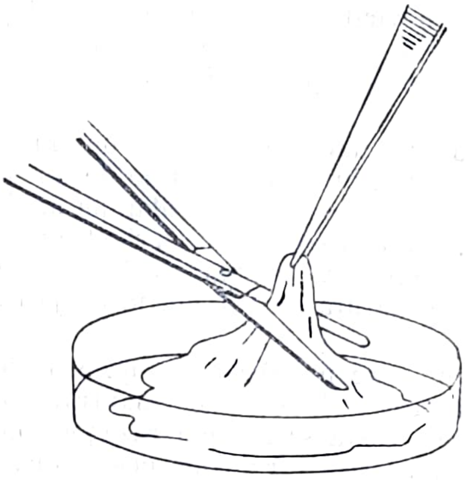


Fig. 507. — Tehnica recoltării membranei viteline.

Recoltarea sacului vitelin și conținutului său se va face astfel :

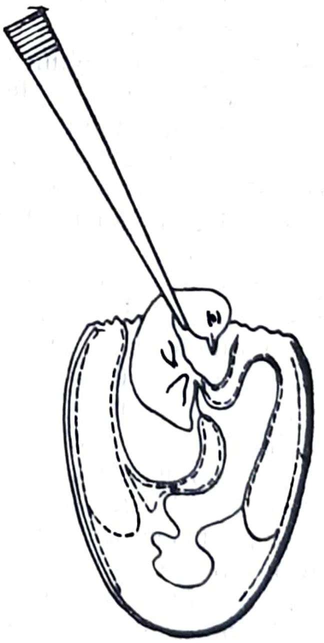


Fig. 508. — Tehnica recoltării embrionului.

Embrionul cu anexele sale fiind depozitat în cutia Petri sterilă, se secționează pediculul și se incizează sacul vitelin, după care, cu o pensă, se apucă sacul, lăsînd să se scurgă conținutul său într-un pahar conic sau o cutie Petri sterilă; aci se lasă și membrana vitelină (fig 507).

Pentru a realiza preparate microscopice se fac amprente din fragmente de membrană vitelină, prelevate de preferință din vecinătatea pediculului.

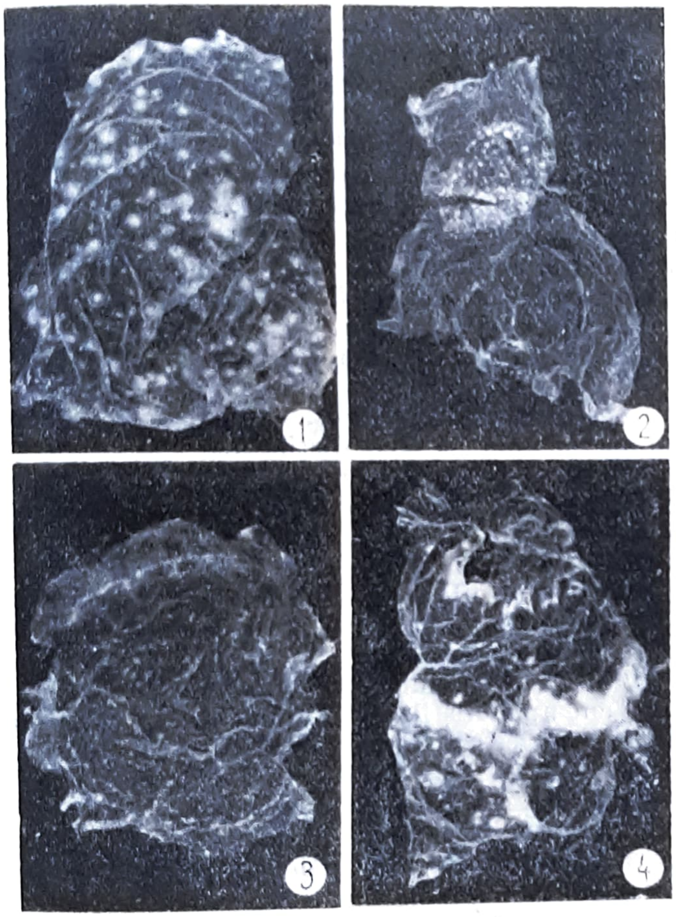


Fig. 509. — Leziuni produse de diferite virusuri pe membrana corioalantoidiană.

1 – leziuni produse de virusul vaccinal; *2* – leziuni produse de virusul Motol (hepatic). ; *3* leziuni produse de virusul Newcastle; *4* – leziuni produse de virusul diftero-variolic.

Membrana corio-alantoidiană se recoltează de obicei după evacuarea oului de conținutul său, avînd grijă ca în momentul în care se elimină embrionul cu anexele sale să se mențină cu o pensă membrana alantoidiană și să se secționeze pediculul.

Pentru a examina membrana, este indicat ca după spălarea ei în ser fiziologic steril să fie introdusă într-o cutie Petri cu ser fiziologic steril, cutia Petri fiind situată deasupra unei coli de hîrtie neagră.

În caz că membrana nu trebuie păstrată steril pentru inoculări ulterioare, se recomandă examinarea sa în apă distilată sau, de preferință, în soluție formol 10%.

Pentru studii microscopice, membrana va fi fixată, fie după răsucirea ei pe un bețișor de chibrit, fie după întinderea ei pe o bucată de hîrtie de filtru, cu care apoi se introduce în fixator.

Embrionii recoltați steril vor fi de asemenea examinați cu atenție, avînd grijă să se observe aspectul general, aspectul tegumentelor, al ficatului, plămînilor și creierului, eventualele malformații etc.

Pentru studii histopatologice se va introduce în amestecul fixator întregul embrion.

INOCULAREA ÎN CULTURI CELULARE

Metoda cultivării inframicrobilor în culturi de celule *in vitro*, folosită încă din 1913 de către Steinhard, Israeli și Lambert pentru virusul vaccinal și de C. Levaditi pentru virusul rabic și poliomielitic, a intrat în practica uzuală a laboratoarelor de diagnostic inframicrobiologic abia în ultimul deceniu, cînd a suferit îmbunătățiri și simplificări remarcabile.

Progresele metodei culturilor celulare s-au bazat pe introducerea în practică a unor descoperiri remarcabile, ca sistemul tuburilor învîrtite, tehnica culturilor de celule în monostrat, obținerea de celule din cele mai variate organe și țesuturi normale sau canceroase, supuse acțiunii tripsinei.

Stabilirea unor linii celulare continue, dar mai ales a precizării „acțiunii citopatogene" a numeroase virusuri, reprezintă elemente care au transformat culturile de celule în cea mai curentă metodă de izolare și identificare a unui extrem de mare număr de inframicrobi, ca și pentru vaste studii imunologice. Bineînțeles că îmbunătățirea și simplificarea continuă a mediilor nutritive de creștere sau de întreținere a celulelor cultivate, imaginea unor tehnici comode, ca „testul de culoare" etc., introducerea în practică a noi țesuturi și organe provenite de la cele mai variate animale adulte sau embrionare, au făcut ca astăzi metoda să fie universal răspîndită, iar tehnicile de lucru, în continuă perfecționare.

Deoarece, în urma progreselor care s-au succedat într-un ritm nemaiîntîlnit în practica virusologică, laboratoarele de diagnostic au fost obligate să-și aleagă din metodele și tehnicile amintite pe cele mai comode și rapide, respectiv pe cele de cultivare a virusurilor în celulele obținute din diferite organe prin metode fizice și în special din metode chimice (tripsinizare, papainizare etc.) sau în diferite ,,linii continue'' de celule normale sau canceroase, ne vom mărgini, în descrierea noastră, numai la aceste tehnici.

Dat fiind că succesul metodei este în cea mai mare parte legat de calitatea materialelor folosite, de eliminarea unor factori aparent banali etc., considerăm necesar să dăm, înainte de descrierea tehnicilor propriu-zise, unele amănunte cu privire la prepararea diferitelor materiale folosite în lucrul curent.

PREGĂTIREA STICLĂRIEI, SERINGILOR ȘI DOPURILOR DE CAUCIUC

Eprubetele, pipetele, baloanele, filtrele, în general întreaga sticlărie folosită pentru realizarea culturilor celulare și a preparării diferitelor soluții și a mediilor nutritive necesare trebuie să fie din sticlă neutră, îngrijită și spălată cu toată atenția. Subestimarea unor amănunte în procesul de pregătire a acestor materiale poate compromite întreaga muncă de obținere a culturilor celulare și de cultivare a inframicrobilor.

Spălarea și sterilizarea sticlăriei se pot face după mai multe tehnici.

Astfel, ea poate fi spălată prin menținere 20–30 de minute într-o soluție de 50‰ săpun fulgi la 60° și apoi spălată cu apă de robinet și de două ori cu apă distilată. După uscare și după pregătirea obișnuită (bușonare cu dopuri de vată și tifon, împachetare în hîrtie etc.), sticlăria se sterilizează la pupinel.

Bune rezultate sînt obținute ghidîndu-ne și după următoarele indicații:

Sticlăria nouă, nefolosită (tuburi, baloane, flacoane pătrate etc.), se debarasează de praf cu apă de robinet și apoi se fierbe 20 de minute în 30 litri de apă, la care se adaugă 500 g detergent (Alba Super). După fierbere, în aceeași apă caldă, se freacă cu o perie specială și se clătește prelungit la apă de robinet. După ce se clătește de 3 ori în apă distilată, sticlăria se usucă la 40–80°, cu gura în jos.

Sterilizarea la pupinel.

Sticlăria veche, folosită, se sterilizează la autoclav după care se lasă 30 de minute în apă fierbinte cu detergent (30 litri apă + 250 g Alba Super). Se spală bine cu peria în această apă și apoi se clătește în 3 băi de apă distilată. Se usucă și se sterilizează, ca și sticlăria nouă.

Pipetele noi se spală cu apă de robinet și apoi se mențin 24 de ore în amestecul:

Acid sulfuric	1 litru
Apă distilată	1 ,,
Azotat de Na	30 g

Se lasă sub apă de robinet în jet continuu 7 ore, după care se clătesc în apă distilată 1 oră. Se lasă în apă distilată 24 de ore și apoi se usucă la 40–80°.

Sterilizarea la pupinel în tuburi portpipete.

Pipetele folosite se sterilizează în soluția de acid sulfuric, după care se clătesc 24 de ore în jet continuu cu apă de robinet. Se clătesc în apă distilată 1 oră și apoi, după menținere 24 de ore în apă distilată, se usucă și se sterilizează ca materialul nou.

Filtrele de sticlă (Schott G5) se pregătesc astfel:

Materialul nou, nefolosit, se spală cu apă de robinet și apoi cu apă distilată.

Se trece o cantitate de 50–250 ml (în funcție de capacitatea filtrului) acid sulfuric sau acid azotic încălzit la 80°, după care se filtrează abundent apă distilată și apoi apă bidistilată. Cînd proba de pH a apei filtrate nu mai indică urme de acid, filtrul se împachetează și se sterilizează la autoclav.

Filtrele folosite sînt clătite imediat după utilizare cu apă distilată (abundent de ambele părți ale plăcii filtrante), după care se filtrează 500–1 000 ml apă bidistilată încălzită la fierbere. După 4–5 filtrări sau dacă filtrul s-a colmatat, se procedează ca pentru filtrele noi.

Seringile folosite vor fi de tip Luer și întrebuințate totdeauna perfect uscate. După spălare cu apă de robinet și apă distilată, ele vor fi uscate și apoi sterilizate la pupinel. Seringile automate, tip Cornwal, se sterilizează prin fierbere.

Dopurile ca și *tuburile de cauciuc* vor fi confecționate obligatoriu din cauciuc natural alb, *niciodată din cauciuc colorat*, deoarece este cunoscută acțiunea toxică pentru celule a acestuia din urmă [1].

Pentru a fi folosite, dopurile și tuburile noi vor fi fierte, timp de 1–2 ore, în soluție de NaOH N/20, și apoi spălate timp îndelungat cu apă de robinet. Într-un timp următor vor fi fierte timp de 10 minute într-o soluție de HCl 4% și apoi clătite abundent cu apă de robinet și apă distilată.

---

[1] În cazul unor dopuri toxice se vor face cîteva autoclavări repetate în soluție de sodă.

Într-un timp următor, se fierb în apă de robinet o oră, din nou o oră în apă distilată, după care se clătesc în apă distilată. Tot în apă distilată se lasă pînă a doua zi, cînd se usucă la 40° și se sterilizează.

Dopurile și tuburile de cauciuc vechi, întrebuințate la culturi inoculate, vor suferi după fiecare utilizare o sterilizare la umed (30 de minute la 120°), după care vor fi fierte 20 de minute în soluție detergentă (30 litri de apă + 250 g Alba Super). Se clătesc abundent în apă de robinet, apoi în 3 ape distilate. Se usucă la 37° și se sterilizează.

Sterilizarea se face la autoclav, dopurile fiind aranjate în cutii Petri, din care vor fi scoase în momentul lucrului cu o pensă, de preferat sub protecția razelor ultraviolete, auxiliar indispensabil al celor ce lucrează în domeniul culturilor celulare.

În cazul în care laboratorul folosește tuburi din *cauciuc-silicon*, pregătirea lor este mult mai simplă, căci ele se spală doar cu apă de robinet.

PREPARAREA DIFERITELOR SOLUȚII ȘI MEDII NUTRITIVE

Soluția Ringer. Într-un balon cotat sau într-un cilindru gradat de 1 000 ml, se introduc 200 ml apă bidistilată, după care se dizolvă, în ordine, următoarele substanțe cîntărite precis :

Clorură de sodiu (NaCl)	9,0 g
Clorură de potasiu (KCl)	0,42 g
Clorură de calciu anhidră ($CaCl_2$)	0,25 g

Se completează cu apă bidistilată pînă la 1 000 ml și apoi soluția se repartizează în baloane Erlenmeyer de 250 ml, care se închid cu dopuri de vată și tifon, învelite în celofan, după care se autoclavează 45 de minute, la 0,9 atmosfere.

După autoclavare, dopurile de vată se înlocuiesc cu dopuri de cauciuc sterilizate.

Soluția se păstrează la gheţar la +4°.

Soluția Tyrode se obține astfel :

Într-un balon cotat sau într-un cilindru de 1 000 ml, în care se introduc 300 ml apă bidistilată, se solvă, în ordinea indicată, următoarele substanțe pure, *pro analisi* :

Clorură de potasiu (KCl)	20 g
Clorură de calciu anhidră ($CaCl_2$)	20 g
Clorură de magneziu cristalizată ($MgCl_2 . 6H_2O$)	10 g
Fosfat monosodic ($NaH_2PO_4 . 2H_2O$)	5 g

Se completează cu apă bidistilată pînă la 1 000 ml. Această soluție constituie soluția mamă. Nu se sterilizează, dar se păstrează obligatoriu la frigider, la +4°.

Pentru a prepara 1 000 ml soluție Tyrode, se ia din soluția mamă 10 ml, se completează cu 990 ml apă bidistilată și se adaugă :

Clorură de sodiu (NaCl)	8 g
Glucoză	1 g

După ce aceste substanțe s-au solvat complet, se adaugă :

Bicarbonat de sodiu ($NaHCO_3$) 1 g

și apoi, după solvarea acestuia, 20 ml din soluția indicatoare de roșu fenol 0,1%.

Soluția finală astfel preparată se sterilizează prin filtrare prin filtru Seitz sub *presiune pozitivă*, niciodată sub presiune negativă, care ar duce la alcalinizare excesivă, prin pierderea bioxidului de carbon.

După filtrare, recipientele sterile în care soluția a fost repartizată se închid cu dopuri de cauciuc alb și se păstrează la gheţar la +4°, avînd o valabilitate de 2—3 luni.

Soluția indicatoare cu roșu fenol se obține triturînd într-un mojar 0,1 g roșu fenol pulbere cu 2,82 ml NaOH N/10. După ce colorantul s-a dizolvat complet, se adaugă cîțiva mililitri de apă bidistilată, după care, într-un balon cotat, se completează cu apă bidistilată pînă la 100 ml. În caz că laboratorul dispune de roșu fenol hidrosolubil, solvarea se face direct în apă distilată.

Soluția se introduce într-un balon Erlenmeyer de 100 ml, care se închide cu un dop de vată și tifon învelit în celofan și se autoclavează timp de 30 de minute la 1 atmosferă.

După autoclavare, dopurile de vată sînt înlocuite cu dopuri sterile de cauciuc natural. Soluția se păstrează la +4°.

Soluția salină Gey. Se prepară două soluții stoc, concentrate de 10 ori :

Soluția 1 :

Clorură de sodiu (NaCl)	80 g
Clorură de potasiu (KCl)	3,75 g
Clorură de calciu ($CaCl_2$)	2,75 g
Clorură de magneziu ($MgCl_2 6H_2O$)	2,10 g
Apă bidistilată	*ad.*1 000 ml

Soluția 2 :

Bicarbonat de sodiu ($NaHCO_3$)	2,5 g
Fosfat disodic ($Na_2HPO_4 2H_2O$)	1,5 g
Fosfat monopotasic (KH_2PO_4)	0,25 g
Glucoză	20 g
Roșu fenol	0,2 g
Apă bidistilată	*ad.*1 000 ml

Soluția 1 se sterilizează la autoclav (20 de minute la 0,8 atmosfere). Soluția 2 se sterilizează prin filtrare după acidifiere prin barbotare cu CO_2. Se păstrează la +4°.

Pentru lucru se diluează în 800 ml apă bidistilată cîte 100 ml din ambele soluții.

Soluția Hanks. Se prepară o soluție concentrată de 10 ori din următoarele substanțe:

a) Clorură de sodiu (NaCl)	80	g
Clorură de potasiu (KCl)	4	g
Sulfat de magneziu ($MgSO_4 . 7H_2O$)	2	g
Fosfat monopotasic (KH_2PO_4)	0,6	g
Fosfat disodic ($Na_2HPO_4 . 2H_2O$)	0,6	g (0,5 g anhidru)
Roșu fenol hidrosolubil	0,2	g
Glucoză	10	g
Apă bidistilată	*ad.*	800 ml

Separat se prepară:

b) Clorură de calciu ($CaCl_2$)	1,4	g
Apă distilată	*ad.*	800 ml

După solvire totală se amestecă cele 2 soluții turnînd încet soluția *b* în soluția *a* și agitînd continuu. Se filtrează prin hîrtie de filtru. Se păstrează la +4°, după ce în prealabil s-a adăugat 1 ml cloroform.

Din această soluție, pentru prepararea soluției de lucru se ia o parte +9 părți apă bidistilată. Se încălzește 20 de minute la 80° (pentru eliminarea cloroformului) și apoi se sterilizează prin autoclavare 20 de minute la 0,8 atmosfere. Se păstrează la +4°.

Soluția Earle. Se prepară inițial 2 soluții:
A — concentrată de 10 ori;
B — concentrată de 20 de ori.

Soluția A:

Clorură de sodiu (NaCl)	68	g
Clorură de potasiu (KCl)	4	g
Fosfat monosodic ($NaH_2PO_4H_2O$)	1,4	g
Bicarbonat de sodiu ($NaH\ CO_3$)	22	g
Glucoză	10	g
Roșu fenol	0,2	g
Apă bidistilată	*ad.*	1 000 ml

Pentru conservare se adaugă 1 ml cloroform.

Soluția B:

Clorură de calciu ($CaCl_2$) anhidru	2	g
Clorură de magneziu ($MgCl_2 . 6H_2O$)	1,7	g
Apă bidistilată	*ad.*	500 ml

Aceste soluții se conservă separat la +4°.

Pentru realizarea *soluției de lucru*, se prepară separat:

100 ml soluție A + 700 ml apă bidistilată
50 ml soluție B + 150 ml apă bidistilată

Primul amestec se încălzește 20 de minute la 80° (pentru eliminarea cloroformului). Se autoclavează separat, 20 de minute, la 0,8 atmosfere, și se amestecă *numai după răcire*. Soluția de lucru se conservă la ghețar, la +4°.

Soluția salină tamponată (*P.B.S.*). Această soluție izotonică tampon-fosfat, cu pH = 7,35, este mult folosită în practica uzuală; se realizează amestecînd 100 ml din soluția A cu 50 ml din soluția B și 50 ml din soluția C (sterilizate separat prin autoclavare 20 minute la 0,8 atm.), după care se completează cu apă bidistilată pînă la 1 000 ml. Amestecul se face numai între soluții răcite.

Soluția A[1]:

Clorură de sodiu (NaCl)	80	g
Clorură de potasiu (KCl)	2	g
Fosfat disodic anhidru (Na_2HPO_4)	11.5	g
Fosfat monopotasic (KH_2PO_4)	2	g
Apă bidistilată	*ad.*	1 000 ml

Soluția B:

Clorură de calciu anhidră ($CaCl_2$)	1	g
Apă bidistilată	*ad.*	500 ml

Soluția C:

Clorură de magneziu ($Cl_2Mg\ 6\ H_2O$)	1	g
Apă bidistilată	*ad.*	500 ml

Soluțiile se păstrează separat timp nelimitat la +4°.

De reținut că pentru soluțiile de tripsină sau versen se va folosi numai soluția A și anume, 100 ml + 900 ml apă bidistilată.

Soluția de hidrolizat de lactalbumină (concentrată de 5 ori) se prepară astfel:

Hidrolizat de lactalbumină NBCo	25 g
Soluție Hanks sau Earle	*ad* 1 000 ml

Se încălzește la 45—50°, se agită pînă la dizolvare și apoi se filtrează prin hîrtie de filtru.

În cazul în care s-a întrebuințat soluția Hanks, pH va fi corectat la 7,2 cu sol. NaOH N/10 sau cu sol. $NaHCO_3$.

Sterilizarea se face prin filtrare.

Soluția-mamă se poate păstra o lună de zile la +4°.

Pentru lucru se folosesc 20 ml soluție concentrată de 5 ori, la 80 ml mediu nutritiv (concentrație finală: 0,5%).

Lichidul amniotic de vacă. Se prelevează, la abator, de la o vacă în a treia, a patra lună de gestație, uterul și se suspendă într-o cameră de laborator, în prealabil iradiată cu ajutorul unei lămpi de cuarț. Uterul se spală cu ser fiziologic steril în partea sa declivă, se badijonează regiunea cu tinctură de iod și apoi se flambează cu flacăra unui bec de gaz.

---

[1] De reținut că uneori, în timpul conservării, sărurile din această soluție pot cristaliza; cristalele se redizolvă prin încălzire ușoară și agitare.

Cu ajutorul unei foarfece ascuțite se incizează musculatura și apoi se străpung foițele embrionare cu ajutorul unui trocar steril. Acesta este adaptat la amboul fixat la un tub de cauciuc, care comunică, prin intermediul unui tub de sticlă, cu un balon de sticlă steril, în care se va scurge lichidul amniotic; *acesta trebuie să aibă un aspect clar citrin.*

După extragerea cantității de lichid necesară, balonul de sticlă se închide cu un dop de cauciuc steril.

Se controlează sterilitatea prin însămînțări în medii obișnuite și apoi lichidul se păstrează la ghețar la +4°, controlîndu-se din cînd în cînd pH lichidului, care nu trebuie să depășească pH = 8.

Extractul embrionar. Deși mulți autori preferă extractul de embrion bovin, noi recomandăm extractul de embrion de găină.

Acesta se obține astfel:

Se recoltează steril 10—12 embrioni de găină în vîrstă de 9—10 zile, care se spală într-o cutie Petri cu ser fiziologic sau, de preferință, cu soluție Ringer. Se elimină ciocul, ochii și extremitățile și se triturează într-un mojar steril, după care se adaugă un volum egal de soluție Hanks.

În caz că laboratorul posedă un omogenizator de tip Turmix, embrionii, după spălare în soluție Ringer, se introduc în aparat într-un volum egal de soluție Hanks și se triturează 30—60 de secunde.

Suspensia obținută cu oricare din procedeele descrise mai sus se menține 30 de minute la temperatura camerei sau la 37°, după care se centrifughează 30 de minute, la 2 500 turații/min.

Lichidul superficial decantat constituie extractul embrionar, care se menține după controlul sterilității, congelat la —30°.

În momentul utilizării, lichidul este decongelat și recentrifugat timp de 10 minute, la 2 500 turații/min., folosindu-se lichidul superficial.

Ultrafiltratul de ser. Date fiind dificultățile deosebite, pentru un laborator obișnuit, de a obține în condiții optime și în cantități suficiente un bun ultrafiltrat de ser de cabaline sau bovine, recomandăm folosirea *serului de bou deproteinizat,* obținut după tehnica M. Țaga.

Se prepară, după tehnica Wildstäter, hidroxid de aluminiu la pH neutru și se sterilizează la autoclav.

După precizarea valorii limită la care are loc deproteinizarea serului sanguin, se amestecă o cantitate de gel de hidroxid de aluminiu cu ser bovin proaspăt, păstrat 24 de ore la frigider, într-o cantitate mai mică cu 1—3 unități față de aceea găsită la testarea de probă.

Serul se amestecă cu adsorbantul prin adăugarea de cantități mici și amestecare continuă îndelungată, cu ajutorul unei baghete de sticlă neutră.

După ce întreaga cantitate de ser a fost adăugată, amestecul se lasă 15 minute la +4° și apoi se centrifughează 15 minute la 4 500 t/m.

Supernatantul, incolor și clar, se recoltează și se filtrează printr-un filtru de sticlă Shott G 5.

Lichidul obținut nu trebuie să conțină urme de proteine la reacția cu acid tricloracetic.

Întreaga operație, care durează 50—60 de minute, se recomandă a fi făcută cu substanțe și în recipiente menținute în prealabil la temperatura ghețarului.

★

După ce am văzut modul de obținere a principalelor constituente ale diverselor medii nutritive folosite în dezvoltarea culturilor celulare, descriem pe scurt — dintre numeroasele *medii nutritive* propuse de diverși autori — cele care par să dea cele mai satisfăcătoare rezultate în lucrul curent.

Astfel, dintre mediile nutritive folosite preferăm mediul Enders, Barski, cel propus de Aderca, și colaboratori, mediul Institutului Pasteur din Paris, ca și mediul sintetic 199

Mediul Enders

Prezintă o formulă folosită pentru dezvoltarea celulelor normale (mediul de creștere) și o alta pentru menținerea culturilor celulare după infectarea lor cu diferite virusuri (mediul de întreținere).

Mediul de creștere (pentru celule normale)

Soluție Hanks	52 ml
Extract embrionar	10 ml
Ser de cal inactivat	20 ml
Ultrafiltrat de ser bovin	18 ml

Mediul de întreținere (pentru celule infectate)

Soluție Hanks	63,8 ml
Extract embrionar	10 ml
Ser de cal inactivat	5,0 ml
Ultrafiltrat de ser bovin	21,3 ml

Fiecăruia din mediile descrise i se adaugă antibiotice în proporție de 200 u. penicilină și 50 μg streptomicină, pentru un ml mediu.

Mediul Barski

Prezintă de asemenea 2 formule (de creștere și de întreținere)

Mediul de creștere :

Ser placentar uman	20 ml
Lichid amniotic	45 ml
Extract embrionar bovin	10 ml
Soluție Hanks	25 ml

Mediul de întreținere :

Lichid amniotic bovin	70 ml
Ultrafiltrat de ser bovin	15 ml
Soluție Hanks	15 ml

Ambelor amestecuri li se adaugă penicilină 200 u., streptomicină 50 μg, pentru fiecare mililitru.

Mediul Institutului de Inframicrobiologie

Folosit pentru celulele embrionare umane, mediul propus de I. Aderca și colab. cuprinde, de asemenea, o formulă pentru creșterea celulelor și o alta pentru menținerea celulelor după inocularea lor cu diferite virusuri.

Mediul de creștere :

Soluție salină Hanks	34,5 %
Soluție salină Earle	34,5 %
Hidrolizat de lactalbumină sol. 2,5 %	20,0 %
Ser de vițel neinactivat	10,0 %
Sol. l-glutamină 200 mM[1]	1,0 %
Penicilină	150 u./ml
Streptomicină	75 μg/ml
Micostatin [2]	20 u./ml

Mediul de întreținere :

Soluție Earle	76 %
Ser de vițel neinactivat	2,5 %
Hidrolizat de lactalbumină, sol. 2,5 %	20 %
Soluție l-glutamină 200 mM	1 %

Mediile pe bază de hidrolizat de lactalbumină propuse sînt favorabile și dezvoltării unor linii de celule continue (HeLa, amnios, KB etc.).

Mediul Institutului „Pasteur" pentru culturi de țesuturi adulte. Comportă, de asemenea două formule diferite : MO_1 și M_1

Mediul MO_1 (de creștere)

Ser placentar uman	20 ml
Ser de cal inactivat	15 ml
Extract embrionar de găină	15 ml
Ultrafiltrat de ser bovin	15 ml
Soluție Hanks	35 ml
Penicilină 1 000 u. ; streptomicină 250	μg/ml

Mediul M_1 (pentru culturi infectate)

Ser de cal inactivat	25 ml
Ultrafiltrat de ser bovin	10 ml
Extract embrionar de găină	15 ml
Soluție Hanks	50 ml
Penicilină 200 u. ; streptomicină 50	μg/ml

În afara acestor medii nutritive descrise se cunosc încă foarte multe altele, cu avantaje și dezavantaje, folosite în funcție de diferitele condiții locale.

După cum s-a amintit, extrem de bun este mediul sintetic 199 (Morgan și colab.), care se găsește sub formă de preparat comercial, dar care poate fi preparat și în laborator, din 14 soluții diverse. Dat fiind că dificultățile de preparare a celor 14 soluții necesare realizării mediului fac ca expunerea lor să depășească cadrul lucrării noastre, ne vom mulțumi numai în a indica cititorului interesat că ele pot fi găsite în : „La poliomyélite", Red. O.M.S. (Geneva), 1955, p. 272, în „Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane" de N. Cajal, Ed. Acad. R.P.R., București, 1958, p. 124 ; în „Culturi de celule în inframicrobiologie" de I. Aderca și colab., Ed. Acad. R.P.R., București, 1962, p. 298.

PREPARAREA FRAGMENTELOR DE ȚESUT

În mod curent, dintre extrem de numeroasele țesuturi și celule propuse (și fără discuție că nu s-a spus încă ultimul cuvînt), în laboratorul de diagnostic curent al inframicrobiozelor umane se folosesc mai frecvent, pregătite după tehnica tripsinizării: embrionul uman, rinichiul de maimuță, amniosul uman, rinichiul de cobai, rinichiul de oaie etc.; ca tulpini celulare se întrebuințează cel mai des celulele HeLa, KB, cele amniotice umane (F.L.), de inimă de *Cynomolgus*, Hep. 2, Detroit 6, Ri.E.U. (rinichi embrion uman). Pi.E.U. (plămîn embrion uman) E.Ș. (embrion șoarece), HLS (limfosarcom uman) etc.

---

[1] Se prepară în apă tridistilată. Se sterilizează prin filtru Shott G 5. Se conservă în stare congelată.

[2] Se folosește miezul dedrajeificat de la 2 drajeuri de Micostatin (500 000 u. fiecare) și căruia, după mojarare, i se adaugă 10 ml alcool 96° și apoi 15 ml apă bidistilată. Se încălzește 10 minute la 56°. Se centrifughează 5 minute la 3 000 turații/min. și se folosește supernatantul (50 u. se găsesc în 0,10—0,15 lichid supernatant).

Bineînțeles că alegerea tipului de țesut depinde, în mare măsură, de inframicrobul cultivat, de posibilitățile locale etc.

Indiferent de tipul de organ sau țesut ales, el se pregătește, în general, pentru obținerea de celule libere, după metoda tratării cu anumite enzime, în special cu tripsină, metodă inițiată de Dulbecco și Vogt. Tripsinizarea poate fi executată după mai multe metode (continuă și discontinuă), cu tehnici variate, mai mult sau mai puțin simple.

La ora actuală tehnica cea mai simplă, recomandabilă laboratoarelor de diagnostic virusologic, este cea cunoscută sub denumirea de *tripsinizare discontinuă deschisă*.

Metoda necesită un vas de tripsinizare, un agitator magnetic, un ultratermostat (Wobser sau Höppler) și o soluție de tripsină. Aceasta se obține prin solvarea tripsinei Difco 1/250 sau NBCo 1/300 în soluție salină tamponată (P.B.S. preparată fără săruri de Ca și Mg), pentru a se realiza o concentrație de 0,25%, după care se sterilizează prin filtrare (pH = 7,4—7,6).

Redăm o tehnică simplă de *tripsinizare discontinuă deschisă*, valabilă pentru diferite țesuturi și organe.

Fragmentele tisulare (embrion uman, rinichi etc.) sînt spălate cu soluție salină tamponată (P.B.S.) de cheagurile de sînge și apoi tăiate în fragmente mici de 1,5—2 mm.

După tăiere, fragmentele de țesut sînt spălate abundent cu soluție salină folosită (P.B.S.); spălarea încetează în momentul în care lichidul de spălare rămîne limpede.

Într-o etapă următoare (care se recomandă a fi făcută imediat)[1], fragmentele de țesut sînt introduse în vasul de tripsinizare[2], în soluția de tripsină (concentrație de 0,25%; pH = = 7,4—7,6). Vasul este așezat într-un cristalizator cu apă, situat pe agitatorul magnetic, reglat la o turație medie. Cu ajutorul ultratermostatului se asigură apei din vas o temperatură de 34° (fig. 511).

După 30—40 de minute, timp în care s-a realizat ceea ce se numește o *pretripsinizare*, se îndepărtează soluția de tripsină și se introduce o soluție proaspătă de tripsină într-un volum de 5—10 ori mai mare decît cel al fragmentelor de țesut. Temperatura va rămîne 34°, iar agitația de intensitate medie[3].

După 10—12 minute[4], lichidul supernatant este trecut cu grijă (pentru a nu elimina și fragmentele de țesuturi) printr-o pîlnie acoperită cu două straturi de tifon, în vasul de recoltare a celulelor (Erlenmeyer), situat într-un recipient mare plin cu gheață (fig. 512).

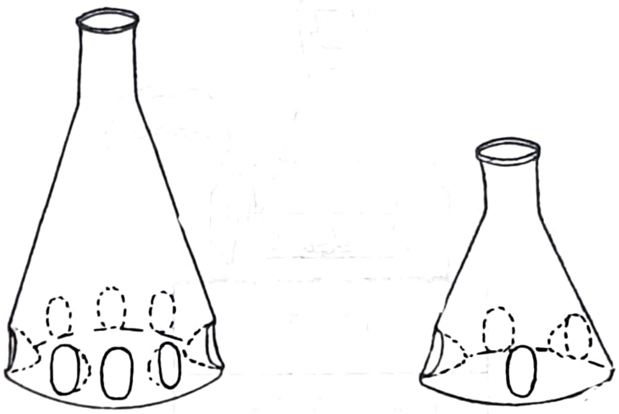


Fig. 510. — Vase de tripsinizare.

În vasul de tripsinizare se introduce o nouă cantitate de soluție de tripsină. Operația se repetă de cîteva ori (15—20) pînă la epuizarea țesutului. Țesutul va fi considerat epuizat cînd capătă un aspect albicios zdrențuit, iar concentrația celulelor din lichid scade foarte mult.

În tot timpul operației de tripsinizare, pîlnia vasului de colectare este acoperită cu capacul unei cutii Petri.

Toate operațiile (introducerea tripsinei în vasul de tripsinizare, eliminarea tripsinei, colectarea suspensiei de celule în soluția de tripsină etc.) se fac cu păstrarea celor mai riguroase reguli de asepsie.

---

[1] În caz că tripsinizarea nu se poate face în aceeași zi, fragmentele de țesut se mențin la ghețar la +4°, într-un vas cu fundul plat (Erlenmeyer), într-o cantitate corespunzătoare de mediu nutritiv.

[2] Un flacon Erlenmeyer de 250—500 ml. căruia i s-au realizat în treimea inferioară 4—5 înfundături de 2—3 cm înălțime și 2 cm adîncime (fig. 510).

[3] Examenul microscopic al unei picături din soluția de tripsină cu celule recoltată steril, permite reglarea turației agitatorului magnetic, Într-adevăr, prezența de numeroase grupe de celule arată o agitație slabă; celulele izolate, resturile de celule și celulele sparte arată o agitație mult prea intensă.

[4] În funcție de țesut, acest timp este variabil: 10—12 minute, pentru țesutul embrionar, 15—18 minute, pentru țesuturi adulte.

După terminarea operației de tripsinizare, lichidul colectat în vasul special este centrifugat la o viteză mică, 500—1 000 turații/min., timp de 10 minute.

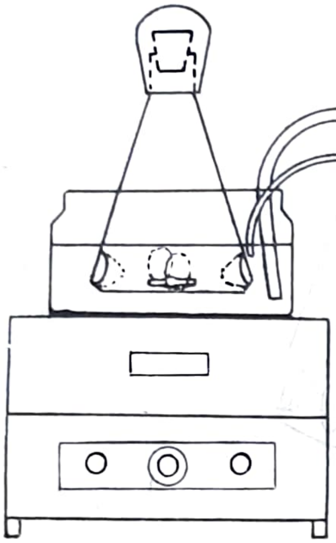


Fig. 511. — Tripsinizare sub agitare continuă și temperatură constantă.

Supernatantul se aruncă, iar sedimentul, albgălbui-roșiatic, va fi resuspendat în mediu nutritiv. Cu ajutorul unei pipete, cu gura mai largă, se realizează o suspensie omogenă. Concentrația în celule pe mililitru a acestei suspensii va fi determinată prin numărătoare microscopică, într-o cameră Bürker-Türk, în cîmpurile rezervate leucocitelor.

În funcție de această numărătoare, se va putea corecta concentrația celulelor în suspensie, astfel încît să se realizeze o concentrație optimă de 300 000—400 000 celule/ml de mediu [1].

După prepararea concentrației de celule dorită, suspensia de celule este menținută cu ajutorul agitatorului magnetic, reglat la o viteză mică, într-o agitare continuă.

Din suspensia de celule astfel realizată se repartizează, de preferință cu seringa automată, cîte 1 ml în tuburi de cultură, care vor fi incubate static la 37°.

Deși datele prezentate sînt valabile pentru majoritatea țesuturilor și organelor, considerăm indicat să dăm unele date suplimentare privind embrionul uman, rinichiul de maimuță și membrana amniotică.

Țesutul embrionar uman se prepară comod, după o tehnică propusă de I. Aderca, și colab.

Se folosesc embrioni obținuți prin întreruperi terapeutice ale sarcinii, de la mame sănătoase, în a II-a — a III-a lună de sarcină. Fragmentele de embrioni sînt recoltate direct într-un cristalizator steril care conține 100 ml soluție Hanks, la care s-au adăugat și antibiotice.

Se recomandă ca de la recoltare și pînă la începerea operațiilor de tripsinizare să nu treacă mai mult de 3 ore.

Se aleg fragmentele de embrioni, eliminîndu-se numai resturile de placentă. Fragmentele sînt spălate în soluție salină tamponată, sterilă, care conține penicilină, streptomicină și micostatin, avînd grijă a se îndepărta cît mai atent cheagurile de sînge aderente de țesut.

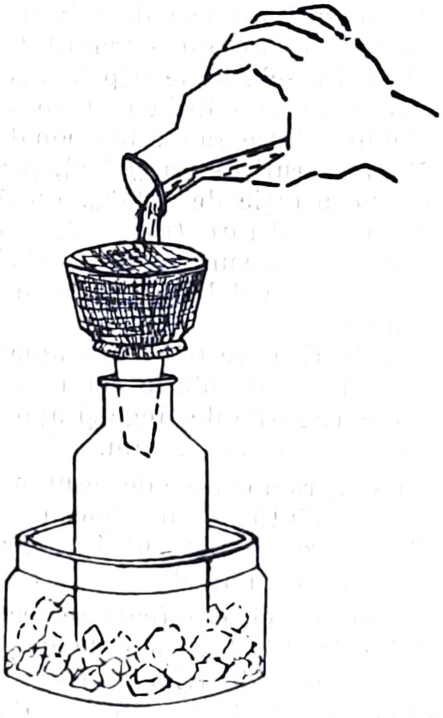


Fig. 512. — Filtrarea după tripsinizare.

După 2—3—4 spălături (în funcție de claritatea lichidului), fragmentele de embrion se foarfecă mărunt (2—3 mm). Micile fragmente, după o nouă spălare, sînt introduse în vasul de tripsinizat și se procedează după indicațiile date mai sus.

---

[1] Examenul se face adăugînd la 1 ml suspensie celulară 2 ml dintr-o soluție de cristal violet 0,1 % în soluție apoasă de acid citric 0,1 M (se dizolvă 2,10 g acid citric în 100 ml apă bidistilată).

Din 10 g țesut embrionar uman se pot obține, prin tripsinizare, 800—1 000 de tuburi de cultură.

Acestea sînt introduse în termostat la 37° în poziție orizontală, cu o ușoară înclinație.

Ca mediu nutritiv, se folosește formula Institutului de inframicrobiologie.

Dezvoltarea culturilor de celule embrionare are loc într-un ritm foarte rapid; la 3 zile de la însămînțare, peretele eprubetei, examinat cu un obiectiv mic, se dovedește acoperit de un strat continuu de fibroblaști. Celulele sînt alungite, fuziforme, cu un nucleu oval, cu 1—4 nucleoli de forme și dimensiuni variate.

La 3—5 zile de la însămînțare, culturile celulare sînt apte de a fi inoculate.

Schimbînd mediul la 5 zile, culturile se mențin bune de folosit timp de 2—3 săptămîni.

Bineînțeles, în afară de tuburi, se pot însămînța și flacoane mai mari [1], care vor permite dezvoltarea de culturi de rezervă, care, prin tripsinizare, sau versenizare vor furniza celule pentru noi tuburi de cultură.

Țesutul renal de maimuță se obține în mod obișnuit de la maimuțe de tip *Cynomolgus*, africane sau *Rhesus*, ca și de la maimuțele de tip *Cercopithecus aethiops sabaeus* sau *Erythrocebus*.

Maimuțele sacrificate prin sîngerare totală, sub narcoză cu eter, sînt deschise, iar rinichii sînt recoltați în mod steril.

Se utilizează zona corticală a rinichilor, care se foarfecă în mod atent, obținîndu-se fragmente de 2—3 mm, care sînt apoi introduse în vasul de tripsinizare și supuse aceluiași tratament ca embrionii umani.

Într-un timp final se realizează în mediu cu hidrolizat de lactalbumină o concentrație de 300 000 celule/ml, din care se repartizează în tuburi cîte 1 ml.

Tuburile se mențin la 37° în poziție orizontală, ușor înclinate, iar stratul de celule epiteliale care se dezvoltă este apt de a fi inoculat la 4—7 zile de la însămînțare.

Din rinichii unei maimuțe se obțin comod 1 000—1 200 tuburi de cultură. Ca și în cazul culturilor de celule embrionare, cu celulele renale simiene se pot pregăti flacoane mai mari, care vor permite dezvoltarea unor culturi de rezervă.

Pentru folosirea acestor culturi stoc se face fie o tripsinizare, fie o *versenizare simplă*. În acest din urmă caz se îndepărtează mediul și se adaugă 60 — 80 ml soluție de versen 0,2‰ [2], încălzită la 37°. După 30 — 60 de minute de menținere la 37°, în care timp se agită de cîteva ori, suspensia este centrifugată la 1 000 turații/min., timp de 15 minute. Se îndepărtează faza lichidă și se înlocuiește cu mediul nutritiv (aproximativ 50 ml). Se face numărătoarea celulelor și se realizează apoi o suspensie finală cu 200 000 celule/ml, din care se trece apoi cîte 1 ml în fiecare tub de cultură.

Trebuie notat că suspensiile stoc de celule versenizate, conținînd aproximativ 500 000 celule/ml mediu (de preferință mediu 199, cu 2% ser de vițel), pot fi păstrate în cele mai bune condiții timp de 2 săptămîni, la +4°.

În momentul întrebuințării se centrifughează, se înlocuiește mediul nutritiv cu mediul proaspăt, procedîndu-se, pentru realizarea de tuburi, ca mai sus.

Celulele amniotice umane se prepară, la rîndul lor, după tehnici similare, din placente recoltate steril, cu cel mult 4 ore mai înainte.

Se suspendă placenta de cordonul ombilical și pornind de la baza cordonului în jos, se începe desprinderea membranei amniotice. Aceasta, după eliberare, este trecută pentru spălare prin 2 — 3 cutii Petri conținînd soluție salină tamponată, după care este tăiată în fragmente de 2 — 3 cm, care apoi sînt trecute în vasul de tripsinizare.

Tripsinizarea se execută la 37°, după tehnica descrisă, în șarje de cîte 5 — 30 de minute, în funcție de rezultatul controlului microscopic.

Cantitatea maximă de celule se obține în șarjele 5 — 8, după care diminuează vizibil, ceea ce obligă ca la a 10-a—a 11-a șarjă să se întrerupă operația de tripsinizare.

Ca medii de creștere se folosesc, cu foarte bune rezultate:

— soluția Hanks 59%, hidrolizat de lactalbumină (sol. 2,5%) 20%; ser de vițel 20%, soluție l-glutamină 1%;

— soluția Hanks 79%, ser de vițel 20%, soluție l-glutamină 1%.

Trebuie de reținut, ca un foarte important element, necesitatea unui pH mai scăzut al mediului inițial (7,1 — 7,2). După ce celulele încep să se dezvolte, mediul poate fi schimbat cu un altul, cu pH de 7,4 — 7,5.

---

[1] Într-un flacon Roux de 1,2 litri se introduc 10 milioane celule; în flacoane de 250 ml se introduc 3 milioane celule.

[2] Soluția de versen se face în soluție salină tamponată (P.B.S.) (fără Ca și Mg). Sterilizarea se face la autoclav la 0,8 atmosfere, 20 de minute.

Culturile sînt apte de a fi inoculate la 4 — 5 zile de la însămînțare.

★

După cum s-a semnalat, în afara culturilor de celule tripsinizate (culturi primare), se folosesc, cu foarte bune rezultate, unele linii de celule continue (HeLa, KB, Detroit 6 etc.). Deși randamentul dat de aceste celule este în general mai mic decît cel furnizat de celulele tripsinizate, folosirea lor este foarte răspîndită, mai ales în laboratoarele care nu necesită constant un volum prea mare de lucru.

Dintre diferitele tulpini cunoscute, datorită rezistenței lor mai mari, recomandăm lucrul cu celulele HeLa.

Provenite dintr-un carcinom de col uterin, aceste celule, întreținute *in vitro* de către Gey, s-au dovedit sensibile la acțiunea patogenă a numeroase virusuri.

Faptul că proliferează rapid și abundent, permițînd o ușoară transplantare în serie, că sensibilitatea crescută la acțiunea patogenă a numeroase virusuri se evidențiază printr-un efect citopatic foarte rapid (12 — 72 de ore) au făcut ca celulele HeLa să fie folosite pe o scară foarte întinsă pentru diagnostic.

Tulpinile stoc sînt menținute în flacoane Roux sau Carrel (se inoculează de obicei 2 milioane de celule într-un flacon de 300 ml), folosindu-se ca mediu nutritiv recomandat: soluția Earle cu 20 — 40% ser de om, de cal, de vițel[1] și 0,5% hidrolizat de lactalbumină și antibiotice.

Incubate la 37°, culturile se dezvoltă perfect la 2 — 4 zile.

Culturile stoc pot fi păstrate la temperatura camerei sau la 30°, mediu trebuind a fi schimbat la 6 — 7 zile.

Transplantarea celulelor în tuburi se face fie după tripsinizare sau versenizare, fie după următoarea tehnică, mai simplă:

Se îndepărtează jumătate din mediul nutritiv și cu ajutorul unei anse de platină sau al unei pipete Pasteur deschise se raclează cît mai bine, de pe pereții flaconului sau tubului, pînza de celule proliferate. Se agită mediul lichid rămas, se aspiră cu o pipetă cu bulă și apoi se centrifughează scurt timp (3 — 5 minute), la turație mică (1 000 turații/min). Se îndepărtează lichidul supernatant și depozitul este barbotat într-o cantitate mică de mediu cu o pipetă Pasteur, pentru a despărți pe cît posibil celulele. Apoi, din această suspensie de celule, se depun pe pereții treimii inferioare a unor eprubete, sterile, sau pe fundul unui flacon Carrel cîteva picături.

Tuburile se închid cu dopuri de cauciuc și se mențin nemișcate 20 de minute la temperatura camerei. După acest timp, necesar aderării celulelor la perete, se adaugă mediul nutritiv (2 ml pentru fiecare tub), după care tuburile se incubează staționar la +37°.

Se va avea grijă ca lichidul nutritiv să acopere peretele pe care s-au depus celulele (perete care totdeauna trebuie marcat cu un creion pentru sticlă) și în același timp să nu atingă dopul de cauciuc (cunoscîndu-se efectul toxic).

Culturile sînt apte de a fi inoculate la 4 — 6 zile de la transplantare.

Liniile de *celule KB*, cele *amniotice umane* etc. sînt menținute și prelucrate întocmai ca și celulele HeLa, cu recomandarea de a nu se folosi serul de om, ci ser de vițel 15 — 20%, în soluție Earle sau Hanks, cu 0,5% hidrolizat de lactalbumină.

Indiferent de tipul de celule folosit, după transplantarea lor, tuburile se mențin în termostat la 37°, în tăvi speciale, ușor înclinate, astfel încît mediul nutritiv să acopere perfect stratul celular, fără ca să riște să atingă dopul de cauciuc.

La 48 și 72 de ore, culturile sînt examinate la microscop cu un obiectiv mic, pentru aprecierea dezvoltării celulelor. Cînd acestea sînt suficient de dezvoltate (pînză celulară continuă), cu aspect normal, se poate trece la infectarea lor (fig. 513).

TEHNICA INOCULĂRII CULTURILOR CELULARE

Într-un prim timp se trece la înlocuirea mediului nutritiv de creștere cu un mediu nutritiv de menținere.

Dintre numeroasele medii propuse, recomandăm mediile pe bază de hidrolizat de lactalbumină sau mediul sintetic 199, cu 20% ultrafiltrat de ser de vită sau cu 2% ser inactivat de cal.

În aceste medii, celulele neinfectate își păstrează intact aspectul normal, fără degenerări nespecifice, cel puțin 8 zile.

Deși majoritatea autorilor preferă înlocuirea mediului în însăși ziua inoculării, recomandăm ca efectuarea acestei operații să se facă cu 24 de ore mai înainte.

---

[1] Dat fiind că unele seruri de om sau animal au o acțiune toxică față de celulele HeLa, nu se vor folosi decît seruri în prealabil testate. Se recomandă ca testarea să se facă înainte de epuizarea stocului de ser anterior.

Într-un timp următor, cu 0,1 — 0,2 ml din fiecare produs virulent, pregătit conform indicațiilor , se inoculează 2 — 4 tuburi de cultură. Aceasta se realizează fie prin introducerea produsului peste stratul de celule (în momentul în care mediul de creștere a fost îndepărtat), fie direct în mediul de întreținere, în prealabil introdus în tub.

În primul caz (introducerea produsului virulent peste stratul de celule), tuburile infectate se lasă 30 de minute la temperatura laboratorului, după care se adaugă mediul de menținere.

După inoculare, tuburile sînt introduse în termostat la 37° și menținute în aceleași condiții ca înainte de infectare.

Totdeauna se vor lăsa 2 — 3 tuburi neinfectate, bineînțeles cu același mediu nutritiv ca al tuburilor infectate; acestea constituie martorii pentru culturile celulare.

Tuburile se controlează microscopic după 48 de ore și apoi zilnic, urmărindu-se modificările morfologice suferite de celule, cu alte cuvinte *efectul citopatic.*

Trebuie știut că, în mod obișnuit, pentru majoritatea virusurilor ,,citopatogene'', modificările celulare apar evidente între 2 și 7 zile de la infectare [1], termen după care degenerările observate nu mai trebuie luate în seamă, ele putînd reprezenta și leziuni de îmbătrînire, intîlnite și în tuburile-martore, prin epuizarea factorilor de creștere din mediu.

Modificările microscopice observate la examenul direct pe preparatele necolorate se caracterizează, pentru cele mai multe virusuri citopatogene, prin rotunjirea și creșterea refrigerenței celulelor, urmată de necrozarea, dispariția nucleului și lizarea treptată a majorității celulelor; în unele cazuri, placardele de celule degenerate se desprind de pe pereții tubului și cad în mediul nutritiv. De remarcat că efectul citopatic cuprinde rapid, pentru unele virusuri, în special pentru cele poliomielitice, întreaga cultură de celule (24 — 36 de ore de la apariția primelor modificări). Acest amănunt este util a fi cunoscut, mai ales pentru diagnosticul diferențial care adesea trebuie făcut cu alte tulpini de virusuri; acestea determină inițial leziuni de focar care se întind încet și care menajează foarte mult celulele din cultură.

Alte virusuri produc efecte citopatice deosebite, în bună măsură, de cele produse de virusurile enterice. Așa sînt virusurile herpetice care produc, de predilecție, într-o anume fază, balonări celulare, ca și celule gigante, multinucleate, adenovirusurile, care produc intense și tipice modificări nucleare (fig. 514), virusul rujeolos care determină sinciții și incluzii numeroase citoplasmice și nucleare etc.

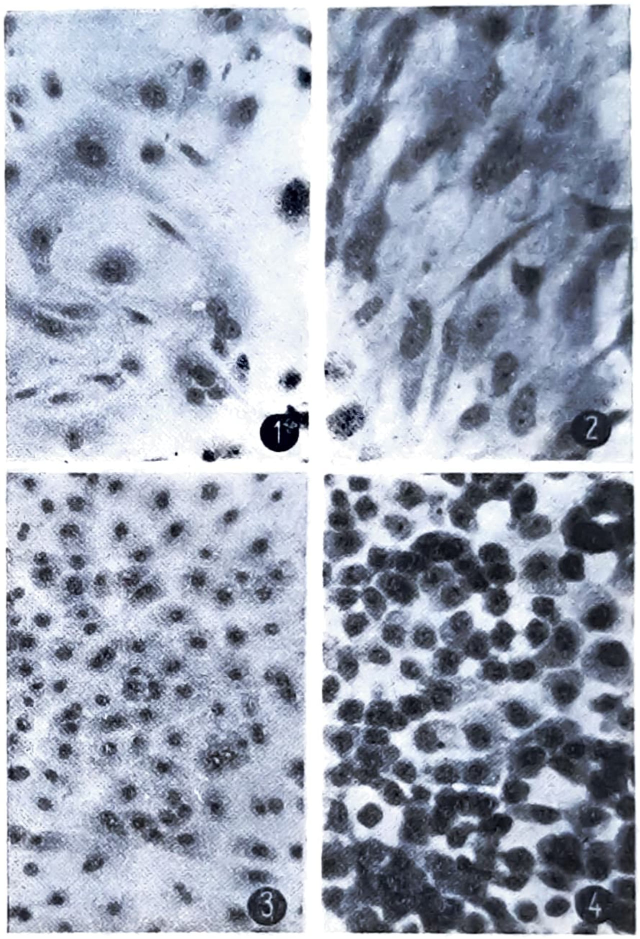


Fig. 513. — Aspectul microscopic al unor culturi celulare (preparate colorate).

1 – celule renale de maimuță: *2* – celule embrionare umane: *3* – celule amniotice umane; *4* – celule HeLa.

Prin tehnicile de colorare a culturilor celulare se pot pune în evidență unele detalii morfologice care scapă în mod obișnuit examenului direct, ca : incluzii celulare, tipuri de degenerare etc. și care furnizează indicații utile dirijării și stabilirii diagnosticului virusologic.

---

[1] Există și virusuri (v. rujeolos, zonatos etc.) care se dezvoltă mult mai încet (14—17 zile); în astfel de cazuri, la 7 zile mediul de întreținere va fi schimbat.

Dintre tehnicile de colorare a culturilor celulare propuse, recomandăm următoarea, ca fiind mai simplă:

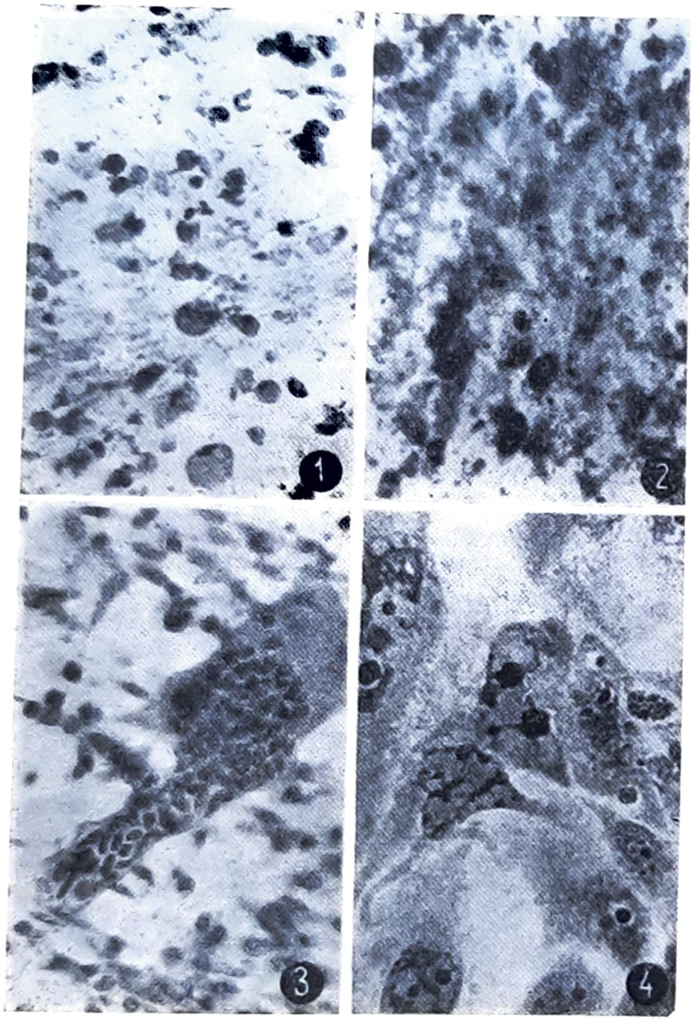


Fig. 514. — Aspectul microscopic al „efectului citopatic" produs de diferite virusuri în culturi de celule embrionare umane (preparate colorate).

1 – efect citopatic produs de virusul poliomielitic 1; 2 – efect citopatic produs de virusul ECHO 4; 3 – efect citopatic produs de virusul herpetic. Se remarcă o celulă gigantă (70 de nuclei); 4 – efect citopatic produs de adenovirus 4 (examinat cu un obiectiv mai mare).

Tuburile de cultură de studiat se fixează prin introducerea în tub a fixatorului (de preferat Dubosq-Brasil-Bouin), care se lasă să acționeze 20 de minute. Se spală cu alcool de 96° și apoi cu apă distilată, pentru îndepărtarea fixatorului, după care se introduce amestecul colorant Giemsa (3 picături la 1 ml apă bidistilată), timp de 1 — 2 ore. Se îndepărtează colorantul și se spală cu apă distilată. Se usucă și se examinează cu un obiectiv mic pe dinafara tubului.

Pentru cercetări morfologice mai detaliate se folosesc, în bune condiții, tuburile Barski (fig. 515), în care se pot introduce lamele de sticlă care, după realizarea culturilor, pot fi scoase și colorate cu diferite tehnici și apoi montate pe lame obișnuite. Se obțin astfel preparate microscopice excelente, pe care, cu ajutorul obiectivului de imersie, pot fi decelate leziunile cele mai fine.

Preparate colorate foarte bune pot fi obținute însă mult mai comod cu o tehnică ingenioasă, realizată cu ajutorul colodiumului, tehnică imaginată de Enders și Peebles.

Iată în amănunt această tehnică, modificată de M. Cepleanu:

1. În momentul în care microscopul descoperă modificări care par că merită un examen mai amănunțit prin colorarea culturii celulare, se elimină într-un prim timp mediul nutritiv din tub.

2. **Se introduc în eprubetă** 10 — 15 ml **soluție fixatoare Dubosq-Brasil-Bouin** și se **lasă 30 de minute.**

3. **Se înlătură fixatorul și se introduce în tub alcool 70°. Se lasă 5 minute.**

4. **Se înlocuiește alcoolul de** 70° **cu alcool de 96°.**

5. **După 5 minute, se înlocuiește** alcoolul de **96° cu alcool absolut.**

6. **După 5 minute se înlătură alcoolul absolut și se introduce în tub un amestec de alcool absolut-eter, în părți egale, ce se lasă, de asemenea, 5 minute.**

7. **Se înlătură amestecul alcool-eter și se umple tubul cu colodiu (6%). Se lasă în repaus 1 — 2 ore.**

8. **Se îndepărtează colodiul. Se învîrtește eprubeta înclinată la 45° (pentru evaporarea eterului) și apoi se lasă cu gura în jos într-un stativ, timp de 4 — 6 minute.**

9. **Se umple eprubeta cu apă distilată,** ceea ce face ca să apară evident sacul de colodiu format pe pereții interni ai tubului.

10. Se desprinde de la gura eprubetei sacul de colodiu. Se continuă încet desfacerea lui de pe pereții tubului cu ajutorul unei baghete de sticlă. După ce sacul a fost complet desprins, se extrage din tub cu ajutorul unei pense.

11. Cu ajutorul unei foarfece se taie fragmentul de peliculă de colodiu care conține

pînza de celule şi se prinde o margine a acestui fragment cu o pensă Pean.

12. Se introduce pelicula în apă distilată, unde se menţine pînă la colorare; aceasta se face cel mai bine cu hematoxilină-eozină:

a) Se introduce pelicula de colodiu în soluţia de *hematoxilină* Harris [1], timp de 5 minute.

b) Spălare în apă distilată.

c) Spălare în apă amoniacală preparată extemporaneu [2].

d) Spălare în apă distilată.

e) Spălare în alcool clorhidric [3].

f) Spălare în apă distilată.

g) Se introduce pelicula în alcool 70°, timp de 5 minute.

h) Se introduce pelicula în alcool 96°, timp de 5 minute.

i) Agitare rapidă în soluţie apoasă de eozină y [4].

j) Spălare în alcool 96°.

k) Spălare în amestec alcool 96° — xilol ($\overline{aa}$).

l) Xilol, 10 minute.

m) Montare în balsam de Canada între lamă şi lamelă.

Ca regulă generală, dată fiind asemănarea efectului citopatic determinat de un mare număr de virusuri, orice izolare pe culturi a unui agent citopatogen va trebui de îndată completată cu probe de neutralizare cu seruri imune, standard, de tip. De asemenea, dat fiind că unele produse virulente, şi mai ales cele preparate din materii fecale, pot determina ,,efecte citopatice'' nespecifice, de natură toxică, vom fi obligaţi a face în continuare încă 1 — 2 treceri pe culturi, folosind ca material virulent mediul nutritiv recoltat la 3 — 7 zile de la inoculare, în momentul în care efectul citopatic este perfect vizibil [5].

În cazul apariţiei efectului citopatic, element de prezumţie important, se va trece la identificarea germenului izolat, prin probe de neutralizare cu seruri standard.

În scopul reducerii efectului citotoxic nespecific al suspensiilor virulente de materii fecale, Enders a propus următoarele modificări în tehnică:

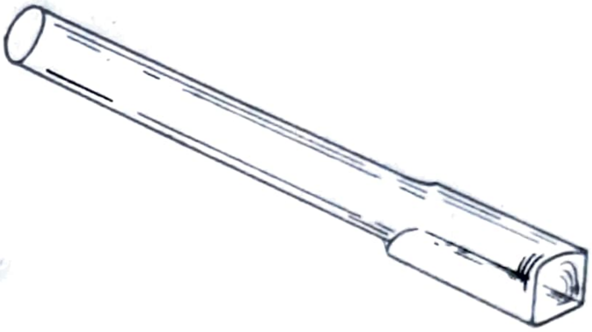


Fig. 515. — Tub Barski.

După 30 de minute de contact între suspensia virulentă şi cultura celulară, se aspiră produsul patogen şi se introduce mediul de întreţinere proaspăt. După 24 — 48 de ore de incubaţie la 37°, se aspiră 1 ml din lichidul nutritiv şi se infectează un tub nou. Se lasă în contact o oră la temperatura camerei, după care se adaugă mediul de întreţinere, după indicaţiile obişnuite.

Bineînţeles că trecerile suplimentare sînt obligatorii numai în cazurile în care materialul virulent este constituit din materii fecale, şi nu atunci cînd se fac inoculări cu tulpini de virusuri de colecţie, cu antigene sau cu produse verificate.

Nu trebuie uitat că există şi virusuri care, deşi cultivă abundent, nu produc ,,efecte citopatice'' decelabile cu mijloacele curente şi că pentru unii din aceşti germeni sînt necesare tehnici mai complicate (testul de hemadsorbţie etc.).

În cazul culturilor pozitive, pentru menţinerea virusului izolat, pentru identificarea lui, pentru treceri ulterioare etc., se va recolta steril mediul de întreţinere, care se va înfiola şi menţine la gheţar, de preferinţă în congelator.

---

[1] Se solvă 1 g hematoxilină în 6 ml alcool etilic 96°. După 4 zile se adaugă 100 ml alaun amoniacal, soluţie saturată (12 g alaun în 100 ml apă bidistilată), şi oxid roşu de mercur (0,5 g pentru fiecare 100 g colorant preparat). Se fierbe şi se răceşte rapid, după care se adaugă 25 ml glicerină şi 25 ml alcool metilic. Se filtrează prin hîrtie de filtru şi se păstrează în sticle cu dop rodat, brune.

[2] 6—7 picături amoniac, la 100 ml apă distilată.

[3] 1 ml HCl, în 100 ml alcool etilic de 70°.

[4] 3 g eozină se dizolvă în 100 ml apă bidistilată şi 125 ml alcool absolut. Se adaugă 375 ml apă bidistilată şi cîteva picături de acid acetic.

[5] Aspirarea mediului se face comod cu ajutorul unei pipete Pasteur, prevăzută cu o pară de cauciuc.

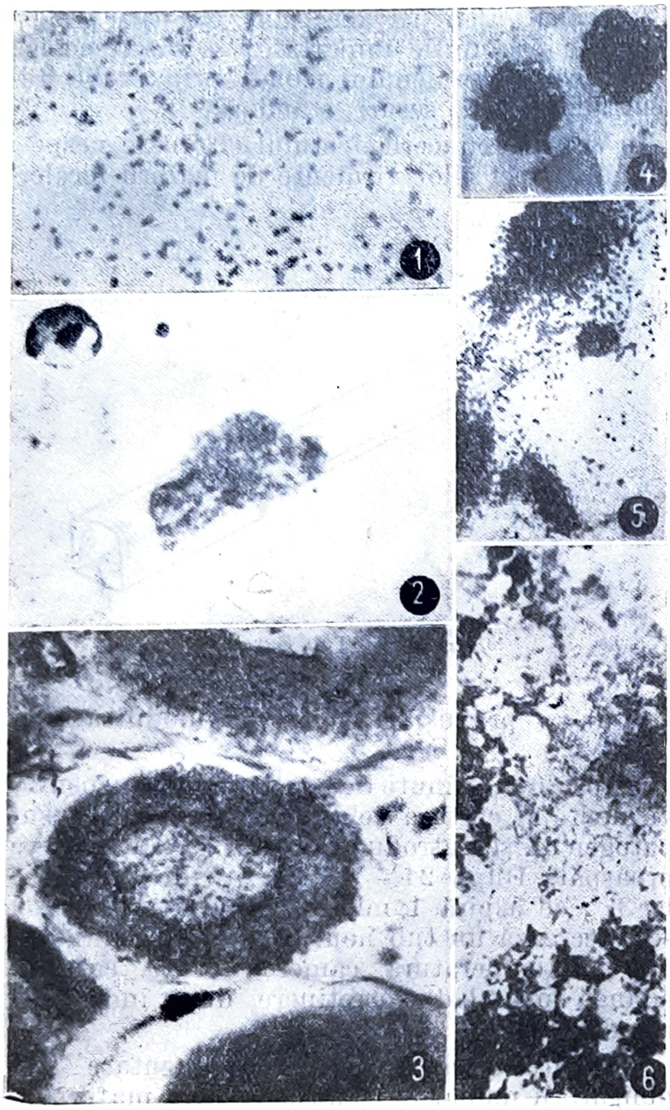


Fig. 516. — Corpusculi inframicrobieni, examinați la microscopul obișnuit, pe frotiuri și secțiuni.

1 — germeni ornitozici (colorație Nicolau cu isamină fenicată); *2* — corpusculi herpetici într-un neuron din encefalul unui iepure (colorație Nicolau-Kopciowska) (după St. Nicolau); *3* — corpusculi Aujeszky intracitoplasmici și intranucleari (colorație albastru de metil oxalatat-fucsină acidă oxalatată) (după St. Nicolau); *4* — germeni ornitozici (colorație Castaneda); *5* — *Rickettsia prowazeki* (colorație Macchiavello); *6* — *Rickettsia burneti* cultivată în sacul vitelin (colorație Macchiavello).

METODE DE CONSERVARE A INFRAMICROBILOR

Una din condițiile indispensabile unui valabil diagnostic de laborator al diferitelor inframicrobioze o constituie buna conservare a materialului infecțios în care urmează să se identifice un virus, precum și a antigenelor virotice.

Pentru conservarea virusurilor s-au recomandat mai multe metode, dintre care unele sînt foarte puțin uzitate (conservarea prin treceri pe animalul sensibil, conservarea pe animalul rezervor), în timp ce alte metode sînt folosite curent în laboratorul de diagnostic (conservarea prin congelare, conservarea în glicerină la temperaturi joase, liofilizarea).

CONSERVAREA VIRUSURILOR PRIN CONGELARE

Este o metodă frecvent folosită, în special pentru materialul infecțios care urmează să fie inoculat animalelor de laborator (probe de materii fecale, fragmente de organe virulente etc.), ca și pentru păstrarea diferitelor tulpini de virus, necesare trecerilor ulterioare.

Pentru conservarea îndelungată a virusurilor s-a dovedit că este suficientă o temperatură de —25 pînă la —30°; aceasta se obține ușor în frigidere speciale de minus, în congelatoare.

Pentru laboratoarele care nu posedă astfel de aparate, temperaturi joase pot fi obținute cu ajutorul unui amestec de ghiață carbonică și alcool, menținut în vase Dewar de 5—10 litri capacitate. În aceste vase, în amestecul congelant care realizează chiar o temperatură de —75°, se pot menține timp îndelungat recipiente cu materialul virulent, bine închise; se vor folosi, de preferință eprubete închise la flacără.

Temperatura scăzută din vasul Dewar se întreține prin completarea regulată a cantității de ghiață carbonică.

Pentru conservarea prin cogelare, fragmentele de organ virulent se introduc în recipiente care conțin ser fiziologic, avînd grijă ca lichidul să depășească nivelul fragmentului de țesut. Prin menținerea recipientului la temperaturi joase (frigider, vase Dewar), se produce congelarea, atît a țesutului virulent, cît și a lichidului care, prin depășirea nivelului fragmentului de țesut, nu permite contactul cu aerul, deci oxidarea.

Suspensiile virulente, lichidele embrionare etc. se introduc ca atare în eprubete sterile, închise cu dopuri de cauciuc sau, de preferință, la flacără.

Unul din inconvenientele acestei metode este acela că în special lichidele embrionare își diminuează mult titrul hemaglutinant. Din această cauză, antigenele folosite în reacția de hemaglutinare nu trebuie menținute în acest fel.

CONSERVAREA VIRUSURILOR ÎN GLICERINĂ LA +4°

Conservarea virusurilor în glicerină la gheţar, la +4°, este una din metodele cele mai comode de conservare a inframicrobilor, folosită sistematic în special pentru menţinerea fragmentelor de organe virulente. Prin acest procedeu, majoritatea virusurilor îşi menţin neştirbite proprietăţile (patogenitatea, antigenitatea) luni sau chiar ani de zile (virusul poliomielitic, herpetic, rabic, Aujeszki etc.). De reţinut că pararickettsiile şi rickettsiile fac, în general, excepţie; ele rezistă numai puţine zile în condiţii similare.

Tehnica de conservare a virusurilor în glicerină este foarte simplă:

Se introduc în mod aseptic fragmente mici de ţesut virulent (2—4 cm) în recipiente care conţin glicerină în cantitate care să permită izolarea fragmentului de ţesut de acţiunea aerului.

Deoarece s-a constatat că uneori glicerina poate prezenta pH acid pronunţat, fapt care poate dăuna calităţii virusului, se recomandă folosirea glicerinei tamponate fosfatate.

Dăm, după P. Lépine, modul de preparare a glicerinei tamponate.

Se folosesc două soluţii mamă: A şi B.

Soluţia A:

Difosfat de sodiu p.a.	179,12 g
Apă distilată	500 ml

Deoarece această soluţie poate cristaliza la temperatura camerei, pentru redizolvare va fi uşor reîncălzită înainte de întrebuinţare.

Soluţia B:

Monofosfat de potasiu p.a.	68,08 g
Apă distilată	500 ml

În momentul preparării glicerinei tamponate, vom stabili dacă glicerina pe care o folosim este slab acidă (pH superior de 5,5) sau puternic acidă (pH inferior de 5,5). În acest scop se diluează o cantitate de glicerină cu apă distilată, neutră, în părţi egale, şi se determină pH cu una din metodele curente.

Pentru o glicerină slab acidă (pH peste 5,5) se întrebuinţează:

Soluţia A	3,5 ml
Soluţia B	1,5 ml
Apă distilată	95 ml
Glicerină	100 ml

Pentru o glicerină puternic acidă (pH sub 5,5) se întrebuinţează:

Soluţia A	8 ml
Soluţia B	2 ml
Apă distilată	90 ml
Glicerină	100 ml

Glicerina astfel preparată va fi repartizată în recipiente de 20—50 ml, închise cu dopuri de vată şi tifon şi sterilizate la autoclav.

După preparare, glicerina poate fi folosită timp îndelungat.

Deoarece atît glicerina, cît şi fosfaţii au o acţiune nocivă asupra diferitelor ţesuturi, în special asupra sistemului nervos central, înaintea folosirii pentru inocularea unui fragment de organ conservat în glicerină, acesta va trebui bine spălat prin agitare în ser fiziologic steril.

CONSERVAREA PRIN DESICARE ÎN STARE CONGELATĂ ÎN VID: LIOFILIZAREA

Această metodă, imaginată de Flosdorf şi Mudd, constînd în congelarea bruscă la temperatură joasă a produsului virulent şi desicare ulterioară cu ajutorul vidului, se realizează în aparate mai mult sau mai puţin complicate.

Virusurile liofilizate îşi păstrează aproape neştirbite toate proprietăţile timp îndelungat. Pe lîngă aceste avantaje, metoda mai permite menţinerea preparatelor liofilizate, chiar la temperatura camerei, ceea ce face posibil şi transportul comod al materialului infecţios.

Există şi unele virusuri care fac excepţie în ceea ce priveşte comportarea lor faţă de liofilizare: aşa sînt virusurile din grupul *Coxsackie*, virusurile poliomielitice, virusurile aftoase.

Cu toate acestea, relativ recent, Kraft şi Pollard au precizat posibilitatea liofilizării, în anumite condiţii, şi a acestor din urmă virusuri.

Pentru realizarea liofilizării este necesară uneori o instalaţie foarte costisitoare. Din această cauză, dintre numeroasele modele de aparate propuse, recomandăm aparatul economic, sterilizabil şi uşor de construit la nivelul oricărui laborator, imaginat de S. Mateescu (Stud. Cercet. Inframicrobiol., 1959, vol. 10, nr. 3, p. 357).

Tehnica liofilizării este în general aceeaşi pentru toate modelele de aparate de liofilizare.

Se introduce aseptic suspensia virulentă în fiolele de liofilizare şi se îngheaţă brusc prin cufundarea într-un amestec refrigerent. Fiola congelată se atașează apoi la pompa de vid și se evacuează aerul din recipient pînă la o presiune de $10^{-1} - 10^{-3}$ mm Hg, ceea ce duce la sublimarea apei din produsul biologic; acesta o dată perfect desicat, se detașează fiola de aparat, prin tăiere la flacără.

După folosire, aparatul trebuie obligatoriu sterilizat[1], deoarece vaporii de apă, scoși din suspensia congelată în timpul procesului de liofilizare, pot antrena uneori și particule virotice, infectînd astfel părțile interioare, componente ale aparatului, și determinînd în consecință infectări ale unor produse și chiar accidente de laborator.

★

Este necesar să se atragă atenția că, în momentul în care se folosește produsul liofilizat, deschiderea fiolei trebuie să se facă cu prudență, sub un clopot sau paravan de sticlă, deoarece, prin tăierea și ruperea fiolei, pulberea virulentă se poate răspîndi în jur, provocînd contaminări accidentale. În același timp, înainte de tăiere, capătul fiolei va fi trecut prin flacără, pentru a preîntîmpina eventuale infectări, prin pătrunderea în fiolă a unor fragmente de sticlă atrase de vidul din fiolă.

De asemenea, trebuie știut că, datorită faptului că prin procesul de sublimare a apei, în momentul actului liofilizării în pulberea virulentă rămîne și sarea de sodiu din serul fiziologic în care s-a realizat suspensia, resuspendarea produsului uscat se face totdeauna în apă distilată, într-o cantitate echivalentă celei inițiale.

METODE FOLOSITE MAI FRECVENT PENTRU EVIDENȚIEREA INFRAMICROBILOR PE FROTIURI ȘI SECȚIUNI

Punerea în evidență a corpusculilor inframicrobieni pe frotiuri sau secțiuni de organe se folosește pe o scară mult mai redusă comparativ cu alte metode pentru diagnosticul unor inframicrobioze umane.

Această limitare a tehnicilor microscopice se datorește, pe de o parte, faptului că numai o parte dintre germenii inframicrobieni sînt vizibili cu microscopul optic, iar pe de altă parte, pentru că aspectul morfologic al inframicrobilor astfel vizibili este aproape identic.

Cu toate aceste obstacole, în laboratorul de diagnostic virusologic se practică, în anumite ocazii, metoda de decelare microscopică a unor inframicrobi, mai ales a celor de tipul pararickettsiilor sau rickettsiilor; de cele mai multe ori, metoda este însă folosită pentru confirmarea unei treceri pozitive a germenilor respectivi în organismele sensibile (ou de găină embrionat, animal reactiv).

Insistăm că examinarea frotiurilor poate pune în evidență existența sau absența corpusculilor elementari, dar că, atunci cînd aceștia sînt decelați, identificarea lor precisă numai pe baza criteriilor morfologice este aproape imposibilă.

Executarea frotiurilor. Pentru realizarea unor bune frotiuri și impresiuni de organe este necesară, în primul rînd, folosirea unor lame de sticlă perfect degresate. Se recomandă folosirea unor lame subțiri, care, în prealabil, au fost pregătite special:

1. menținerea 24 de ore în amestec sulfocromic (bicromat de potasiu, 100 g; acid sulfuric concentrat, 100 ml);

2. spălare, aceeași durată de timp în apă curgătoare;

3. păstrare în alcool 50%, pînă în momentul întrebuințării, cînd sînt șterse cu tifon curat.

Frotiurile se realizează diferit după materialul cercetat. Astfel, se pot face impresiuni din diferite organe (creier, plămîn, ficat, splină, membrană vitelină etc.), prin simpla atingere a unui fragment pe suprafața lamei.

Se pot face, de asemenea, frotiuri, întinzînd pe suprafața lamei o picătură din lichidul de puncție pleurală (ornitoză, febră Q), peritoneală (limfogranulomatoza experimentală a șoarecelui), parotidiană (oreion), testiculară (rickettsioze experimentale), din produsul obținut prin puncționarea unei adenite limfogranulomatoase, unor elemente eruptive (varicelă, zona zoster etc.), precum și cu unele lichide embrionare recoltate din ouăle embrionate, în care au fost cultivați unii inframicrobi, secreții conjunctivale, secreții uretrale etc.

Frotiurile, o dată realizate, sînt colorate, direct sau după o fixare prealabilă.

Se obișnuiește însă ca, înainte de fixare, ele să fie menținute 10 minute în apă distilată, pentru dezalbuminare.

Fixarea se face fie cu alcool metilic, fie cu eter-alcool, fixatorul ales depinzînd de tehnica de colorație folosită. Unele colorații (Macchiavello, Nicolau, Castaneda, modificată de Lépine) nu necesită o fixare prealabilă.

---

[1] Sterilizarea se poate efectua cu ajutorul unui curent de vapori de apă, supraîncălziți la aproximativ +130°.

Metodele de colorare a frotiurilor. Metodele de colorare propuse pentru cercetarea inframicrobilor pe frotiuri sînt numeroase. Dintre acestea, cel mai des folosite sînt:

1. Coloraţia Romanowski-Giemsa.
2. Coloraţia Morozov.
3. Coloraţia Nicolau cu isamină fenicată.
4. Coloraţia Castaneda.
5. Coloraţia Macchiavello.
6. Coloraţia Zdrodovski.
7. Coloraţia Graçian.
8. Coloraţia Lépine.

Ultimele 5 coloraţii se recomandă în special pentru studiul pararickettsiilor şi rickettsiilor.

Coloraţia Romanowski-Giemsa. Amestecul colorant se foloseşte într-o concentraţie dublă faţă de a celei utilizate curent pentru examene hematologice.

Tehnica se execută în modul următor:

1. Frotiurile subţiri se introduc (cu faţa în jos) în cutii Laveran, în care se găseşte amestecul colorant, realizat extemporaneu după formula următoare:

Apă distilată neutră	15 ml
Colorant Romanowski-Giemsa	XXX picături

Cutia Laveran se introduce pentru 12 ore într-un termostat reglat la 45°; în acest timp se recomandă schimbarea de 3—4 ori a amestecului colorant.

2. Spălare în apă distilată.
3. Diferenţierea în alcool de 95° (diferenţierea se realizează trecînd alternativ frotiurile rapid în alcool de 95° şi apă distilată, pînă cînd fondul preparatului examinat la microscop apare debarasat de precipitate).
4. Uscare.
5. Examinare cu obiectivul de imersie.

Rezultate. Corpusculii elementari apar coloraţi în nuanţe purpurii pe un fond roz-palid (examenul microscopic trebuie făcut cu multă atenţie, deoarece unele precipitate pretează la confuzii)[1].

Coloraţia Morozov. Bazată pe metoda impregnării argentice, metoda foloseşte 3 soluţii: *a*, *b* şi *c*.

Soluţia a (lichidul Rüge):

Acid acetic glacial	1 ml
Formol comercial 40 %	2 ml
Apă distilată	100 ml

Soluţia b:

Tanin	5 g
Fenol	1 ml
Apă distilată	100 ml

Soluţia c:

Soluţie de argint amoniacal,

care se prepară în modul următor:

Se solvă 5 g nitrat de argint în 100 ml apă bidistilată; 20 ml din soluţie se pun deoparte, în timp ce celorlalţi 80 ml li se adaugă, picătură cu picătură, o soluţie de amoniac concentrat pînă cînd precipitatul brun format nu se mai solvă, dînd un aspect slab opalescent. În acest moment se iau cei 20 ml soluţie lăsată deoparte şi se toarnă picătură cu picătură în soluţia de argint amoniacal, pînă cînd apare o uşoară opalescenţă.

Soluţiile se păstrează în flacoane brune, bine închise.

Tehnica coloraţiei propriu-zise este următoarea:

1. Frotiul nefixat este ţinut 15 minute în apă distilată.
2. Uscare.
3. Se acoperă lama cu soluţia *a* 1 minut.
4. Spălare cu apă distilată.
5. Se acoperă lama cu soluţia *b* şi se încălzeşte pînă la emisie de vapori.
6. Spălare foarte rapidă, 30 de secunde, în apă distilată.
7. Se acoperă lama cu soluţia *c*, diluată în momentul întrebuinţării 1/10 în apă distilată.
8. Se încălzeşte 1 — 2 minute, pînă cînd preparatul devine brun închis, avînd grijă ca soluţia să nu fiarbă.
9. Spălare cu apă distilată.
10. Uscare.
11. Examinare cu imersie.

Rezultate. Corpusculii inframicrobieni sînt coloraţi în brun închis-negru, substanţele albuminoide în maron sau galben închis, fondul galben sau galben-brun.

Examenul microscopic trebuie făcut cu multă atenţie, deoarece unele precipitate pretează la confuzii.

Recent, M. A. Morozov a arătat că examinînd frotiurile colorate cu metoda sa în cîmp întunecat, corpusculii elementari apar de culoare albă pe fond negru, diferenţiindu-se foarte bine de componentele corpusculare celulare, ca şi de precipitate.

---

[1] Pentru evitarea precipitatelor se recomandă filtrarea colorantului înainte de întrebuinţare.

Colorația Nicolau cu isamină fenicată. Este o metodă simplă, care folosește un singur colorant :

Albastru de isamină (purissim pentru injecții intravenoase)	1 g
Acid fenic	3 g
Alcool etilic	10 ml
Apă distilată	20 ml

Tehnica colorației este următoarea :

1. Frotiul, nefixat sau fixat cu alcool metilic, este ținut 15 minute în apă distilată pentru dezalbuminare.
2. Uscare.
3. Se acoperă lama cu amestecul colorant.
4. Se încălzește la flacără pînă la emisie de vapori de 4 ori în 10 minute, avînd grijă ca soluția colorantă să nu fiarbă.
5. Spălare rapidă cu apă de robinet.

Rezultate. Corpusculii elementari apar colorați în albastru deschis.

Metoda cu isamină fenicată prezintă marele avantaj, față de celelalte metode descrise mai sus, că, deși colorează mai palid unii corpusculi virotici, nu produce niciodată precipitate care să preteze la confuzii.

Colorația Castaneda (*modificarea Lépine*) :

1. Se prepară separat o soluție de Azur II 1% în apă fenicată 0,5% și o soluție de carbonat de potasiu 1% în apă distilată.

În momentul întrebuințării se amestecă într-o eprubetă :

Soluție de Azur II	X picături
Soluție CO_3K_2	V picături
Formol neutru	0,5 ml
Apă distilată	10 ml

Cu amestecul astfel realizat se acoperă frotiurile nefixate, uscate, timp de 3 — 4 minute.

2. Spălare cu apă de robinet.

3. Tratare foarte rapidă (5 — 10 secunde) cu soluție apoasă de safranină 1%.

4. Spălare cu apă de robinet, uscare.

Rezultate. Corpusculii pararickettsieni și rickettsieni apar colorați în albastru-azur, citoplasma celulară în roz palid, iar nucleii în violet.

Colorația Macchiavello (*modificarea Zdrodovski*). Metoda folosește 2 soluții : A și B.

Soluția A (se poate menține numai cîteva zile la gheţar) :

Fucsină bazică	1 g
Fenol	5 g
Alcool etilic	10 ml
Apă distilată	100 ml

Soluția B :

Albastru de metilen, soluție apoasă 0,5%.

Timpii colorației sînt următorii :

1. Frotiurile subțiri, fixate rapid la flacără, sînt acoperite pentru 5 minute cu amestecul colorant realizat extemporaneu, după formula :

Soluția A	10 — 15 picături
Apă bidistilată sau tampon fosfat pH = 7,4	10 ml

2. Spălare cu apă distilată.

3. Diferențiere foarte rapidă (1 — 3 secunde) într-o soluție slabă de acid citric 0,50% sau acid acetic, 0,15%.

4. Spălare prelungită cu apă distilată.

5. Colorare rapidă (10 secunde) cu soluție B.

6. Spălare cu apă de robinet.

7. Uscare, examinare cu imersie.

Rezultate. Rickettsiile apar colorate în roșu rubiniu, care contrastează cu fondul albastru deschis (tehnica dă rezultate excelente numai cînd este folosită pentru colorarea preparatelor proaspete).

Colorația Zdrodovski cu tiamină fenicată:

Pentru preparate vechi, P. F. Zdrodovski a imaginat o colorație simplă, cu tiamină fenicată.

1. Frotiurile subțiri sînt fixate la flacără și apoi sînt acoperite timp de 5 minute cu soluția colorantă pregătită în felul următor :

În 10 ml apă bidistilată se pun 10—15 picături din amestecul :

Tiamină	1 g
Fenol	5 g
Alcool etilic	10 ml
Apă bidistilată	100 ml

2. Spălare prelungită cu apă de robinet.
3. Uscare, examinare.

Rezultate. Rickettsiile apar colorate în albastru închis, pe un fond albastru deschis.

Colorația Graçian (*pentru rickettsii*) :

1. Frotiurile sînt acoperite cu xilol timp de 10 minute.
2. Spălare repetată cu alcool de 96° cîteva secunde.
3. Spălare cu apă distilată.
4. Tratare cu o soluție saturată de bicromat de potasiu, timp de 5 minute.
5. Spălare cu apă de robinet.
6. Frotiurile sînt acoperite timp de 10 — 20 de minute cu o soluție apoasă de colorant

Romanowski-Giemsa (1 ml colorant + 9 ml apă bidistilată).

7. Spălare cu apă de robinet, uscare.

Rezultate. Rickettsiile apar în roșu sau albastru-violet, contrastînd cu fondul palid al preparatului.

Colorația Lépine ;

1. Frotiurile sînt fixate 5 minute în lichidul Regaud preparat extemporaneu :

Sol. apoasă de bicromat de potasiu 3%	4 părți
Formol neutru	1 parte

2. Spălare în apă de robinet.
3. Colorare 1 – 2 minute în :

Fucsină Ziehl	3 ml
Acid fenic 3%	27 ml

4. Spălare în apă de robinet.
5. Diferențiere 2 – 3 minute cu o soluție apoasă saturată de vezuvină filtrată.

Rezultate. Fondul preparatului este incolor, leucocitele colorate în brun închis, celulele endoteliale în galben pal, rickettsiile în roșu.

Colorarea inframicrobilor pe secțiuni. În afara examinării corpusculilor inframicrobieni pe frotiuri, uneori se ivește necesitatea – este adevărat, mult mai rar de a pune în evidență astfel de germeni pe secțiuni din diferite organe obținute după incluzionarea la parafină.

Deși numărul amestecurilor fixatoare propuse sau folosite în diferite laboratoare de specialitate este mare, recomandăm fixatorul Dubosq-Brasil-Bouin, care furnizează bune rezultate :

Alcool 90°	150 ml
Formol comercial	60 ml
Acid acetic glacial	15 ml
Acid picric	1 g

Fixarea se realizează în 2 – 3 zile, la temperatura camerei, sau în 1 – 2 ore la 56°.

Pentru colorarea inframicrobilor pe secțiuni cele mai bune rezultate se obțin cu metodele Romanowski-Giemsa, Nicolau-Kopciowska și Giemsa tanin-oranj G.

Metoda Romanovski-Giemsa :

1. Secțiunile deparafinate se țin 10 minute în apă distilată, după care se introduc cu fața în jos, într-o cutie Laveran, în soluția colorantă :

Amestec colorant Romanowski-Giemsa	1 ml
Apă distilată	15 ml.

Lamele se mențin în acest amestec 24 – 48 de ore, avînd grijă ca Laveranul să fie perfect închis și ținut la întuneric. Este de recomandat schimbarea la 12 ore a colorantului cu un altul proaspăt (cînd colorația ține 24 de ore) și la 12 și 24 de ore cînd colorația se prelungește la 48 de ore.

2. Spălare 15 minute cu apă distilată.
3. Deshidratare în alcool absolut.
4. Se trece apoi la timpul cel mai dificil al metodei, la *diferențiere.* Aceasta se realizează picurînd atent, pe suprafața secțiunii, din amestecul :

Esență de cuișoare	10 ml
Alcool absolut	90 ml

În momentul în care colorarea secțiunii inițial albastră începe să vireze spre roz, se spală abundent cu alcool absolut.

5. Clarificare în xilol sau toluol.
6. Montare în balsam de Canada.

O colorație mai rapidă se poate realiza la cald, folosind un amestec colorant mai concentrat (2 picături colorant la 1 ml apă distilată).

În acest scop, lamele deparafinate, după ce sînt spălate cu apă distilată, sînt depuse în amestecul colorant cu fața secțiunilor în jos. Cutia Laveran este introdusă în termostat la 45°, timp de 12 ore, în care timp colorantul este înlocuit de 2 – 3 ori.

După 12 ore, secțiunea hipercolorată este trecută alternativ în alcool de 95° și apă distilată, pînă cînd fondul preparatului apare la microscop roz pal-mov.

În acest moment se trece piesa în alcool absolut și apoi se clarifică în toluol sau xilol. Se montează în balsam de Canada.

Rezultate. Corpusculii inframicrobieni apar în roz aprins sau purpuriu pe un fond roz-mov, iar nucleii în violet deschis.

Metoda Nicolau-Kopciowska cu albastru de metil oxalatat-fucsină acidă oxalatată. Metoda folosește două soluții : A și B.

Soluția A

Fucsină acidă	1,5 g
Alcool metilic	33 ml
Glicerină	5 ml
Soluție acid oxalic 6 %	2 ml
Apă distilată	60 ml

Soluția B

Albastru de metil	1,5 g
Alcool metilic	33 ml
Glicerină	5 ml
Soluție acid oxalic 6 %	2 ml
Apă distilată	60 ml

Colorația se realizează astfel:

1. Se acoperă secțiunea deparafinată și hidratată cu soluția A, 1 — 2 ore.

2. Se varsă colorantul și, fără se să spele, se acoperă secțiunea cu soluția B, 10 — 15 minute

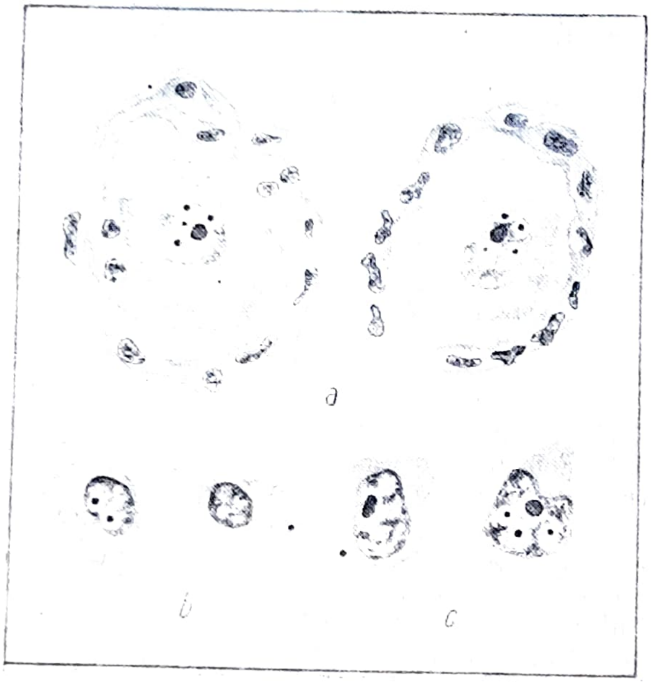


Fig. 517. — Incluziuni spontane în neuronii ganglionului Gasser (*a*), în celule parotidiene (*b*) și amigdaliene umane (*c*) (colorație Mann).

3. Se spală abundent cu alcool absolut.

4. Clarificare cu xilol sau toluol.

5. Montare în balsam de Canada.

Rezultate. Corpusculii elementari apar în nuanțe variind de la albastru deschis la violet, pe un fond bleu. Corpusculii elementari degenerați, surprinși în faza de incluziogeneză, apar în nuanțe roșiatice. Incluziile celulare apar în roșu închis.

Colorația Giemsa-tanin-oranj G. Secțiunile deparafinate și spălate bine cu apă de robinet se tratează astfel:

1. Spălare cu apă neutră:

Fosfat disodic	2 g
Fosfat monopotasic	1 g
Apă distilată	100 ml

2. Colorare cu soluție Giemsa preparată extemporaneu:

Colorant Giemsa	25 picături
Apă neutră	25 ml.

Se schimbă colorantul la 12 ore. Preparatul se menține în colorant 24 — 48 de ore.

3. Spălare cu apă de robinet.

4. Diferențiere în soluție tanin-oranj G., în 3 băi de cîte 5 minute, pînă la obținerea culorii galben-oranj.

Soluția tanin-oranj:

Acid tanic	5 g
Oranj G	1 g
Apă distilată	100 ml.

5. Spălare rapidă cu acetonă p. a.

6. Clarificare cu toluol sau xilol.

7. Montare în balsam de Canada.

Rezultate: corpusculii inframicrobieni apar în violet intens; nucleii în brun; citoplasma și hematiile în galben.

METODE DE EVIDENȚIERE, ÎN SCOP DIAGNOSTIC, A INCLUZIILOR CELULARE

În afară de modificările tisulare nespecifice produse de inframicrobi — și care nu permit decît în foarte rare cazuri stabilirea unui diagnostic histopatologic mai mult sau mai puțin cert (poliomielită, hepatită) — într-un număr destul de mare de viroze umane se întîlnesc și modificări celulare cu un anumit grad de specificitate. Este vorba de *incluziile celulare*.

Acestea sînt formațiuni sferice sau ovalare cu dimensiuni care variază de la limita vizibilității la cîțiva microni (de obicei pînă la 5 — 6 μ, excepțional pînă la 20 μ), situate în interiorul celulelor parazitate de virus, în citoplasmă sau nucleu. Prezentînd de cele mai multe ori o afinitate cromatică oxifilă, incluziile apar de obicei înconjurate de un spațiu clar, de un halou caracteristic, ceea ce ajută mult identificarea lor.

Datorită aspectului morfologic și tinctorial, frecvenței și localizării în celulă, ca și zonelor tisulare în care predomină, incluziile celulare reprezintă, în numeroase viroze, elemente extrem de utile precizării diagnosticului.

Bineînțeles că criteriul decelării incluziilor celulare nu va reprezenta decît rareori un element unic pentru diagnostic; evidențierea lor va trebui coroborată, de cele mai multe ori, cu alte metode experimentale.

Cu toate acestea, pentru diagnosticul histopatologic de prezumție, ca și pentru confirmarea bolii experimentale la animalul de laborator, cunoașterea incluziilor celulare reprezintă un factor important.

În tabelul 156 se pot urmări o parte din inframicrobiozele caracterizate prin incluzii și localizarea lor în celulă.

TABELL 156

Prezența incluziilor celulare în diferite viroze umane și sediul lor în celulă

Viroze (în ordinea alfabetică)	Incluzii nucleare	Incluzii citoplasmice	Observații
A.P.C. (adenoviroze)	+ +		
Boala citomegalică	+ +	+ +	
Conjunctivita cu incluzii		+ +	
Febra galbenă	+ +	Extrem de rare	
Hepatita Botkin	+ +		
Herpesul	+ +	+	
Molluscum contagiosum		+ +	
Parotidita epidemică		+	
Poliomielita	±		Discutabile
Psittacoză-ornitoza		+	Excepțional de rare, discutabile
Rujeola	+ +	±	
Trahomul	+	+ +	Discutabile
Turbarea	Cu totul excepțional	+ +	
Uretrita cu incluzii		+ +	
Vaccina		+ +	
Varicela	+ +	+	
Variola	+	+ +	
Veruci	+		
Zona zoster	+ +	+	

În afară de incluziile patognomonice pentru unele viroze, inframicrobiologul trebuie să cunoască și existența unor incluzii așa-zis „spontane", care pot fi întîlnite, atît la om cît și la animalul de experiență.

Este vorba de existența unor incluzii citoplasmice sau nucleare, în diferite organe sau țesuturi, și a căror prezență nu poate fi pusă în legătură, în mod precis, cu o anumită viroză.

Cunoașterea lor este însă obligatorie pentru experimentator, deoarece îl poate feri de erori în diagnostic.

Dintre *incluziile „spontane" ale omului* cităm cele descrise în citoplasma celulelor epiteliului bucal, a celulelor epiteliale hepatice, cele din nucleul neuronilor din ganglionii Gasser, din nucleul și citoplasma celulelor căilor respiratorii, celulelor parotidiene, pancreatice, amigdaliene (S. Nicolau și N. Cajal) (fig. 434), cele din medulosuprarenale (Bonciu și Demetrescu) etc.

Dintre *incluziile „spontane" ale animalelor* de laborator este necesar să fie cunoscute incluziile nucleare hepatice, incluziile α și β din neuronii encefalici (fig. 518 și 519), ca și cele din nucleul și citoplasma rinichiului de șoarece, incluziile din nucleii celulelor glandelor submaxilare, din celulele tubilor contorți din rinichiul șobolanilor, cele din citoplasma neuronilor amonieni ai spermofilului, incluziile nucleare din glandele submaxilare ale cobaiului, incluziile corneene la iepure, incluziile nucleare hepatice, renale, parotidiene, submaxilare, cele din celulele care tapisează canaliculele biliare, mucoasa nazală etc., la maimuță.

★

Trebuie știut însă că nu orice formațiune inclavată într-o celulă reprezintă o incluzie virotică. Există adesea, în special în citoplasmă, resturi celulare fagocitate, mase de pigment, produse de degenerescența nucleară, bacterii etc., cu care nu trebuie confundate incluziile; există, de asemenea, posibilități de a lua drept incluzii virotice formațiunile intracelulare, în special cele nucleare, care pot apărea după administrarea generală sau locală de anumite toxice [„incluziile toxice" din rinichiul și ficatul animalelor intoxicate cu plumb (Ș. Nicolau), cu arsen trivalent și bismut (R. Demetrescu) etc.].

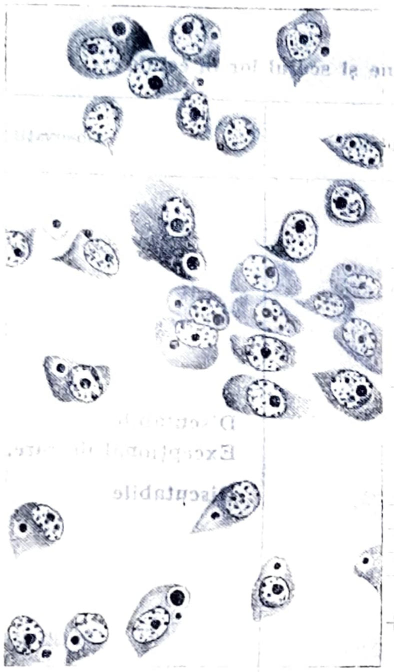


Fig. 518. — Incluziuni α în neuronii encefalici ai șoarecelui (Șt. Nicolau).

METODE DE COLORARE A INCLUZIILOR

Incluziile celulare virotice pot fi puse în evidență pe secțiuni de organe sau pe frotiuri cu ajutorul unor tehnici variate.

Colorația incluziilor pe secțiuni. Dintre metodele de colorare cel mai frecvent folosite vom descrie metodele Mann, Dobell și Cowdry.

Metoda Mann este cel mai des întrebuințată în laboratoare, în special pentru colorarea corpilor Babeș-Negri, dînd rezultate excelente în evidențierea majorității incluziilor virotice.

S-au descris cîteva variante ale tehnicii originale, dar dintre ele preferăm modificarea propusă de Ș. Nicolau și L. Kopciowska:

1. Secțiunile bine deparafinate sînt hidratate în apă distilată și apoi introduse în amestecul colorant.

Acesta se realizează extemporaneu, amestecînd:

Soluția apoasă de albastru de metil 1%	17 ml
Soluția apoasă de eozină gălbuie 1%	23 ml
Apă distilată	50 ml.

Soluțiile de albastru de metil 1% și eozină 1% se pot menține timp îndelungat la ghețar.

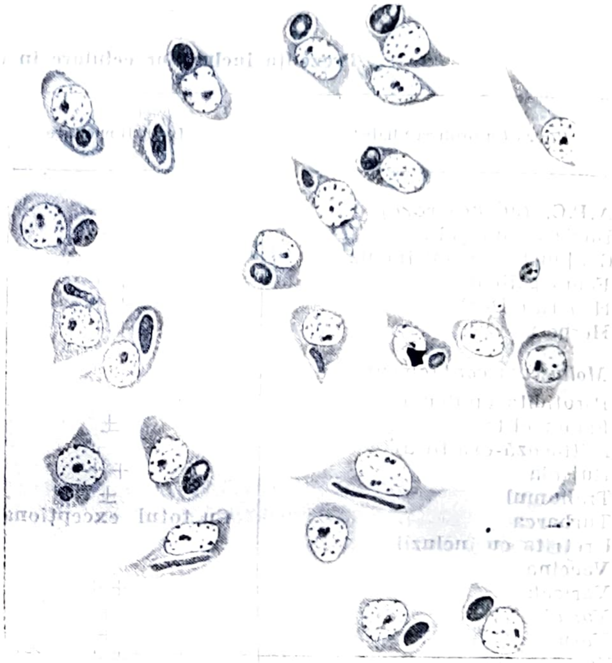


Fig. 519. — Incluziuni β în neuronii encefalici ai șoarecelui (Șt. Nicolau).

Colorația se face în 24 de ore la temperatura camerei sau în 1 1/2 — 2 ore la +56°.

2. După acest timp, secțiunile se scot din colorant și se spală în alcool absolut.

3. Diferențiere atentă în alcool sodat (soluție alcoolică de hidrat de sodiu 2%, 1 ml; alcool absolut, 30 ml)[1].

Se agită ușor și cu răbdare alcoolul sodat din cutia Petri în care se face diferențierea, pînă cînd secțiunea capătă o culoare roz.

4. Spălare abundentă cu alcool absolut.

5. Trecere rapidă în alcool acetic (20 ml alcool absolut + 1 picătură acid acetic glacial). Secțiunea capătă o culoare albastră.

6. Din nou rapid în alcool absolut.

7. Clarificare în xilol.

8. Montare în balsam de Canada.

Rezultate: celulele apar colorate în albastru deschis, nucleii în violet, nucleolii în roșu-violaceu, hematiile în roz, iar incluziile celulare, în roșu strălucitor.

---

[1] Acestui timp trebuie acordat o atenție deosebită, alcaliul trebuind să acționeze într-un mediu perfect anhidru, pentru a evita acțiunea lui caustică asupra elementelor celulare.

Uneori, în special în cazul rabiei, incluziile celulare pot apărea în nuanțe variind de la albastru la roșu. Trebuie reținut că în unele viroze (veruci, papilom, *Condiloma acuminatum*) există constant incluzii bazofile.

Tehnica Dobell:

1. Secțiunile deparafinate și hidratate sînt introduse în amestecul colorant Mann pentru 12 ore.
2. Spălare cu apă de robinet.
3. Diferențiere în soluție diluată de oranje G în alcool 70°.
4. Deshidratare rapidă.
5. Montare în balsam de Canada.

Rezultate. Cu această tehnică incluziile apar colorate în roșu viu.

Colorația Cowdry:

1. Secțiunile deparafinate și hidratate sînt introduse într-o soluție apoasă, 2,5% de floxină, timp de o oră, la 55° [1]. Răcire.
2. Spălare cu apă.
3. Colorare 10 — 20 de minute cu un amestec colorant preparat din 2 soluții: A și B.

Soluția A:

Albastru de metilen	1 g
Borat de sodiu	1 g
Apă distilată	100 ml

Soluția B:

Azur II	1 g
Apă distilată	100 ml

Cîte 5 ml din soluțiile A și B se introduc într-o cantitate de 100 ml apă distilată. Se agită bine și apoi prin hîrtie de filtru, se picură abundent pe lamă.

4. Spălare.
5. Diferențiere în alcool de 95° în care s-a adăugat soluție alcoolică de colofoniu 5%, pînă la obținerea unei nuanțe roz.
6. Deshidratare în alcool absolut.
7. Clarificare în xilol.
8. Montare în balsam de Canada.

Rezultate. Nucleii apar colorați în roșu violaceu-violet, bazicromatina în violet, incluziile în roșu viu.

Colorația incluziilor pe frotiuri. Pentru punerea în evidență a incluziilor pe frotiuri s-au propus, de asemenea, mai multe metode. Considerăm util să recomandăm metoda cu amestecul Mann la cald, ca și metodele Muromțev și Sellers.

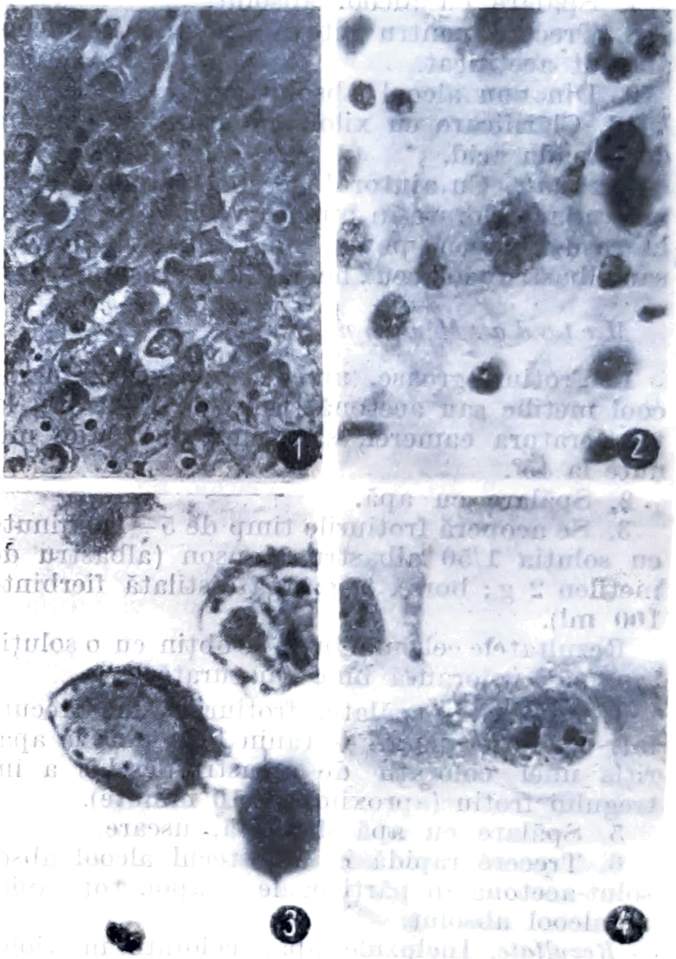


Fig. 520. — Diferite incluziuni celulare virotice.

1 — incluziuni vaccinale în celulele membranei corioalantoidiene; *2* — hepatită Botkin: incluziune nucleară într-o celulă hepatică; *3* — incluziuni herpetice în nucleul unor celule cultivate *in vitro*; *4* — pseudoincluziuni produse de adenovirusuri în nucleul unei celule cultivate *in vitro*.

Colorația cu amestecul Mann la cald:

1. Frotiurile subțiri sînt fixate în alcool metilic timp de 5 minute.

---

[1] În cazul în care fixarea pieselor se face în amestecul Zenker — așa cum prevede tehnica originală — înainte de introducere în soluția de floxină, secțiunile trebuie ținute 15 minute în alcool iodat 1/200, apoi spălate cu apă de robinet și introduse pentru 5 minute într-o soluție de hiposulfit de sodiu 1/200, după care sînt din nou spălate cu grijă.

2. Uscare.
3. Se acoperă lama cu amestecul colorant Mann; se va prefera o soluție veche de 2—3 zile sau chiar mai veche.
4. Se încălzește cu o flacără pînă la emisia de vapori de 4 ori în 10 minute, avînd grijă ca amestecul colorant să nu fiarbă.
5. Spălare rapidă cu alcool absolut.
6. Diferențiere foarte rapidă în alcool sodat.
7. Spălare cu alcool absolut.
8. Trecere pentru cîteva secunde în alcool absolut acetificat.
9. Din nou alcool absolut.
10. Clarificare cu xilol, montare în balsam de Canada acid.

Rezultate. Cu ajutorul acestei metode, incluziile apar colorate în nuanțe variind de la roșu la roșu-violaceu, pe un fond albastru deschis sau albastru violaceu; hematiile, în roșu murdar.

Metoda Muromțev:

1. Frotiuri groase, umede, se fixează în alcool metilic sau acetonă, timp de 1—2 ore, la temperatura camerei, sau timp de 20 de minute la 45°.
2. Spălare cu apă.
3. Se acoperă frotiurile timp de 5—10 minute cu soluția 1/50 albastru Manson (albastru de metilen 2 g; borax 5 g; apă distilată fierbinte 100 ml).

Rezultatele cele mai bune se obțin cu o soluție „mamă" colorantă bine maturată.

4. Fără a fi spălate, frotiurile sînt trecute într-o soluție apoasă de tanin 10% pînă la apariția unei colorații de albastru-deschis a întregului frotiu (aproximativ 10 minute).
5. Spălare cu apă distilată, uscare.
6. Trecere rapidă în amestecul alcool absolut-acetonă în părți egale și apoi, tot rapid, în alcool absolut.

Rezultate. Incluziile apar colorate în violet pe un fond albastru palid, cu nucleii albaștri.

Metoda Sellers:

1. Impresiuni sau frotiuri subțiri, obținute prin presiune pe lame de sticlă curate, perfect degresate, se introduc, încă umede, pentru 2—5 minute (după grosimea lor), în amestecul colorant Sellers care folosește 2 soluții: A și B.

Soluția A:

Albastru de metilen	10 g
Alcool metilic debarasat de acetonă, q.s.p.	1 000 ml

Soluția B:

Fucsină bazică	5 g
Alcool metilic debarasat de acetonă, q.s.p.	500 ml

Amestecul colorant se prepară astfel:

Soluția A	2 părți
Soluția B	1 parte.

Se amestecă cu grijă și se maturează 24 de ore, după care se conservă timp îndelungat, în flacoane de sticlă cu dop rodat.

2. Frotiurile scoase din amestecul colorant se spală rapid cu apă de robinet și se lasă să se usuce.

Rezultate. Celulele nervoase apar colorate în albastru deschis, țesutul interstițial în roz, hematiile în roșu-portocaliu, iar incluziile în nuanțe de la roșu magenta la roșu strălucitor, uneori cu o structură internă corpusculară albastru închis-negru.

De remarcat că, datorită manoperelor de preparare a frotiurilor, incluziile pot fi deseori găsite și extracelular.

★

Deși cercetarea incluziilor pe frotiuri poate aduce de multe ori servicii diagnosticului rapid, trebuie subliniat că uneori metoda poate preta la erori, mai ales în cazul rabiei, prin confundarea incluziilor rabice cu cele jigodioase, ce se pot găsi uneori în cantitate apreciabilă, în cornul Ammon al cîinilor.

TEHNICI SEROLOGICE FOLOSITE CURENT ÎN DIAGNOSTICUL UNOR INFRAMICROBIOZE

Prin progresele realizate în tehnicile de preparare și purificare a antigenelor, prin descoperirea la unele virusuri a unor proprietăți (hemaglutinarea etc.) care se lasă anulate de serurile imune, prin aprecierea în dinamică a evoluției anticorpilor serici, prin simplificarea unor tehnici (executarea reacțiilor pe plăci etc.), reacțiile serologice, considerate timp îndelungat ca nefolositoare diagnosticului inframicrobiologic, au fost astăzi introduse larg în practica uzuală.

Utilizarea lor atît de răspîndită se datorește de altfel și faptului că o parte din tehnicile serologice se folosesc nu atît pentru un diagnostic direct prin evidențierea anticorpilor serici, ci mai ales pentru identificarea unor virusuri izolate în diferite gazde sensibile.

Deşi pentru studiul diferitelor inframicrobioze s-au propus numeroase probe serologice, în acest capitol vom descrie numai pe acelea care au o largă aplicaţie practică; totodată, dintre numeroasele tehnici propuse pentru fiecare reacţie, am ales pe cele mai simple şi care totodată furnizează cele mai bune rezultate, în mare majoritate experimentate şi verificate în Institutul de inframicrobiologie al Academiei R.P.R.

REACŢIA DE HEMAGLUTINARE ŞI HEMAGLUTINOINHIBARE

Din 1941, cînd Hirst ca şi MacClelland şi Hare au observat aglutinarea hematiilor embrionilor de găină în contact cu virusul gripal, numeroşi autori au descris producerea acestui fenomen şi sub influenţa altor inframicrobi: virusurile amarile, virusurile ARBOR, ECHO (numai unele tipuri), hepatitice Botkin şi sclerogen, adenovirusuri, Newcastle, virusul rujeolos, urlian, vaccinal, variolic, pararickettsia ornitozei etc.

Completarea hemaglutinării cu tehnica inhibării aglutinării sub acţiunea virusului omolog a făcut ca această metodă să devină indispensabilă oricărui laborator de diagnostic virusologic.

Într-adevăr, folosind aceste proprietăţi şi aducînd modificări şi simplificări tehnicilor iniţiale, cercetătorii au izbutit să facă din fenomenul de hemaglutinare şi hemaglutinoinhibare una din metodele serologice cele mai des folosite în diagnosticul unui mare număr de viroze, atît prin identificarea germenului inframicrobian, cît şi a anticorpilor serici hemaglutinoinhibanţi.

Deşi reacţia este simplă, pentru obţinerea de rezultate cît mai bune trebuie reţinute cîteva amănunte.

Trebuie cunoscut în primul rînd că *aspectul hemaglutinării* nu este totdeauna acelaşi pentru toate virusurile. Astfel, în timp ce unele virusuri produc o aglutinare tipică, pulverulentă sau grunjoasă, altele, ca cel urlian sau cele hepatitice, produc pe lîngă aglutinare şi o liză mai mult sau mai puţin intensă a hematiilor.

În ceea ce priveşte *intensitatea hemaglutinării*, ea derivă în general după specia animală de la care provin eritrocitele. Astfel, virusurile gripale aglutinează puternic eritrocitele de găină, cobai şi om şi mult mai slab hematiile muridelor; virusul hepatitei sclerogene aglutinează intens hematiile de găină şi cobai, mai slab cele de berbec şi om şi foarte slab hematiile de broască; virusul febrei galbene aglutinează puternic hematiile de pui de găină de o zi şi aproape de loc cele de pui mai vîrstnici etc.

De altfel, în ceea ce priveşte afinitatea pentru diferitele hematii, ea poate diferi atît de la un virus la altul, cît şi de la un tip la altul în cadrul aceluiaşi virus.

Astfel, virusul gripal de tip A aglutinează hematiile de găină, cobai, om, berbec, etc., dar nu aglutinează hematiile de cal, porc sau pisică, hematii care pot fi însă aglutinate de virusul gripal B; virusul vaccinal aglutinează hematiile de pui de găină, dar nu şi pe cele de vrabie; germenii din grupul ornitozei aglutinează exclusiv hematiile de şoarece, virusul rujeolos — hematiile de *Macacus Rhesus*, virusul encefalitei de primăvară-vară aglutinează eritrocitele de berbec, în timp ce alte virusuri din grupul ARBOR, mai ales hematiile de pui de găină de o zi, cele de gîscă etc.

Mai mult, recent s-a dovedit că există diferenţe între hematiile din cadrul aceleiaşi specii. Astfel, hematiile de cocoş dau rezultate pozitive cu virusurile ARBOR grup A şi B, în timp ce hematiile de găină nu sînt aglutinate de aceleaşi virusuri.

Aceste stricte relaţii dintre unele virusuri şi diferite eritrocite trebuie perfect cunoscute de virusolog, în vederea stabilirii unui corect şi rapid diagnostic, în vederea eliminării erorilor posibile.

Reacţia de hemaglutinare

Executarea în practică a reacţiei de hemaglutinare şi a celei de hemaglutino-inhibare — complement obligatoriu pentru diagnostic — este foarte simplă.

Material necesar. Soluţie de citrat de sodiu 3,8% sterilă sau soluţie Alsever.

Soluţie fiziologică de NaCl 9‰ (preparată cu apă bidistilată).

Una seringă de 5 ml.

2 ace de puncţie venoasă.

2 eprubete de centrifugă.

3 pipete gradate de 1 ml (se adaugă cîte una pentru fiecare ser în reacţia de inhibare).

3 pipete gradate de 5 ml.

2 pipete cu bulă şi tub de cauciuc.

Cilindru gradat de 100 ml.

Eprubete de hemoliză (cîte 10 pentru fiecare antigen în reacţia de hemaglutinare şi cîte 10 pentru fiecare ser în proba de inhibare).

Eprubete 160 × 16 (cîte una pentru fiecare ser).

Stative pentru eprubete, cu placa inferioară perforată.

Alcool, eter, vată.

Înainte de a trece la executarea reacției de hemaglutinare propiu-zisă este necesară prepararea suspensiei de hematii și a antigenului respectiv.

Prepararea suspensiei de hematii. Se folosesc de obicei hematii de găină, dar pentru unele virusuri, după cum am arătat, este necesară alegerea unor hematii de specii animale diferite.

Sîngele pentru prepararea hematiilor se recoltează prin puncție pe o soluție anticoagulantă. Cel mai des se folosește soluția de citrat de sodiu 3,8 sau 5%, sau soluția Alsever[1].

Lichidul anticoagulant este folosit în proporție de 1 ml citrat de sodiu sau 5 ml soluție Alsever pentru 5 ml sînge.

Pentru sîngerare, la găină se puncționează inima sau vena umerală, la cobai inima, la berbec vena jugulară etc.

Un amănunt interesant pentru buna desfășurare a reacției îl constituie ritmul în care se recoltează de la animal sîngele; rezultate corecte se obțin numai cu hematii prelevate de la animale care nu sînt sîngerate mai des de 2 ori pe lună.

După recoltare, hematiile se spală de 3 ori prin centrifugare cu soluție fiziologică NaCl 9‰, preparată cu apă bidistilată sau cu soluție tampon veronal[2].

În caz că lichidul de spălătură nu este perfect limpede, după a 3-a spălare, se va repeta operația pînă la obținerea unui lichid supernatant clar. Hematiile obținute după ultima spălare vor fi imediat folosite; dacă aceasta nu este posibil, ele se vor conserva obligatoriu la ghețar, unde valabilitatea lor este de 3–4 zile. Pentru o conservare mai prelungită (10 zile), hematiile spălate se amestecă în proporție egală cu lichidul Alsever.

Indiferent de metoda de conservare folosită, înainte de realizarea suspensiei de hematii pentru reacție, eritrocitele vor trebui bine spălate, de 3–4 ori prin centrifugare. (Nu se vor întrebuința decît hematiile care după 3–4 spălări nu mai prezintă aspecte de hemoliză.)

Suspensia de hematii se realizează cel mai frecvent 0,50% din sedimentul obținut după ultima spălare, în soluție fiziologică de NaCl 9‰ preparată din apă bidistilată (pH 7,1–7,2) sau în soluție tampon veronal.

Deși este mai laborios, pentru o mai precisă apreciere a rezultatelor reacției de hemaglutinare, pentru o cît mai perfectă concordanță a acestora, se recomandă lucrul cu o concentrație constantă de hematii și care se poate realiza prin standardizarea suspensiei cu ajutorul fotometrului.

Suspensia de hematii se prepară cu puțin timp înainte de efectuarea reacției (maximum 4–5 ore). După preparare și pînă la folosire se recomandă menținerea la +4°.

Prepararea antigenului. Antigenul folosit în reacția de hemaglutinare diferă pe de o parte după scopul diagnosticului, pe de altă parte după virusul hemaglutinant.

Într-adevăr, în unele cazuri urmărim *stabilirea prezenței virusului* în produse patologice sau organe și apoi identificarea lui prin reacția de hemaglutino-inhibare cu seruri cunoscute; în alte cazuri cu antigene cunoscute, preparate în laborator, facem reacția de aglutinare pe care o vom supune inhibării cu serurile necunoscute de diagnosticat. În acest din urmă caz vom preciza afecțiunea prin *identificarea anticorpilor hemaglutino-inhibanți*, prezenți în serul bolnavului sau convalescentului.

În primul caz (stabilirea prezenței virusului în anumite produse) se folosesc ca antigen: *saliva* (în oreion), *spălăturile nazo-faringiene* (în gripă), *materiile fecale* (în gripă, hepatita Botkin și sclerogenă, poliomielită etc.), *urina* (în hepatita Botkin și sclerogenă), *serul sanguin* (în hepatita epidemică), *trituratul de pustule* obținute prin raclaj (în variolă, vaccină), *emulsiile de organe* recoltate la necropsie atît de la oamenii morți în urma unor afecțiuni inframicrobiene (ficatul — în hepatite epidemice, febră galbenă; plămînul, traheea — în gripă, sindrom toxico-septic al sugarului; creierul — în encefalite etc.), cît și de la animalele infectate experimental (de la șoarece — plămînul, în gripă; de la cobai — splina în meningita limfocitară cu virus Colentina; de la pasăre — creierul și splina în pseudopesta aviară Newcastle etc.).

---

[1] Glucoză 20,5 g; citrat de sodiu 8 g; NaCl 4,2 g; apă distilată 1 000 ml. Se aduce la pH 6,1 cu o soluție de acid citric 5%. Se sterilizează 3 zile consecutiv, 30 de minute, la 100°. Valabilitate 4–5 săptămîni.

[2] Tamponul pe bază de veronal (Mayer și colab.) se prepară astfel: se dizolvă 4,6 g acid dietilbarbituric în 500 ml apă caldă, tridistilată pe sticlă. Se adaugă: clorură de sodiu 83,8 g, bicarbonat de sodiu 2,52 g, dietilbarbiturat de sodiu 3 g, clorură de magneziu 1 g, clorură de calciu 0,2 g. Se răcește și apoi se completează cu apă tridistilată pînă la 2 000 ml. Se autoclavează 20 de minute la 105°; pH = 7,3–7,4. Se conservă la ghețar la 4°. În momentul folosirii se realizează o diluție 1/5 în apă tridistilată.

Din ouăle embrionate inoculate se vor recolta lichidele amniotic sau alantoidian (oreion, gripă etc.), membrana corioalantoidiană (Newcastle) sau chiar întregul embrion (gripă, hepatite epidemice).

Saliva, spălăturile nazo-faringiene și *urina* se centrifughează 5—10 minute la 3 000 de turații/min., iar lichidul supernatant constituie antigenul cu care se va lucra în reacție.

Materiile fecale se emulsionează în proporție de 1/10 soluție fiziologică de NaCl 9‰ (preparată cu apă bidistilată) și apoi se centrifughează 10 minute la 3 000 de turații/min. Se lucrează numai cu lichidul supernatant, pe care-l vom recolta avînd grijă să evităm inelul de grăsimi de la suprafața lui, element generator de rezultate nespecifice.

Suspensiile de organe se obțin după triturarea fină și suspendarea lor în soluție fiziologică de NaCl 9‰, de obicei în proporție de 1/10. Suspensia se centrifughează 15 minute la 3 000 de turații/min.; lichidul supernatant recoltat cu precauție, pentru a nu lua și inelul superior de grăsimi (în special în cazul folosirii ficatului), reprezintă antigenul.

Dacă fragmentele de organe au fost ținute în glicerină, ele vor fi, înainte de triturare, foarte bine spălate în apă fiziologică sterilă.

Lichidele amniotice sau alantoidiene se folosesc ca atare după recoltarea lor din ouăle ai căror embrioni au fost sacrificați prin menținere 6—12 ore la +4°.

Păstrarea la temperaturi sub 0° nu este recomandabilă, deoarece înghețarea lichidelor embrionare duce la formarea de cantități mari de urați care, putînd adsorbi virusurile, sărăcesc lichidele de conținutul în corpusculi inframicrobieni.

Cînd reacția de hemaglutinare se face cu virusuri cunoscute, în scopul identificării anticorpilor hemaglutinoinhibanți din serul de cercetat, se vor folosi *antigene standard*.

Ele se prepară pe ouă de găină embrionate sau pe animale de experiență, în funcție de afinitatea virusului respectiv, folosindu-se fie lichidele embrionare, fie suspensiile de organe bogate în virus.

După obținerea antigenelor conform indicațiilor date pentru fiecare virus în parte și după verificarea valorii lor față de seruri standard, ele sînt păstrate la ghețar la +4°, temperatură la care marea majoritate a acestor antigene se pot conserva în bune condiții. Cînd antigenele trebuie păstrate mai mult timp se recomandă adăugarea mertiolatului de sodiu sau de potasiu în proporție de 1/10 000.

Tehnica reacției de hemaglutinare. Reacția de hemaglutinare se execută în mod curent în eprubete, dar ea poate fi perfect realizată și pe plăci cu godeuri.

Indiferent de tehnica folosită trebuie acordată o atenție specială alegerii și întreținerii sticlăriei.

Eprubetele trebuie să prezinte fundul rotunjit și egal; ele vor fi perfect curate (tratate cu amestec sulfocromic, apoi spălate cu apă de robinet și clătite cu apă distilată) și folosite exclusiv pentru reacția de hemaglutinare.

Iată tehnica propriu-zisă a reacției:

Se lucrează în 9 tuburi de hemoliză aranjate într-un stelaj cu placa inferioară perforată.

Cu excepția primului tub, se pipetează în fiecare eprubetă cîte 0,50 ml lichid diluant (ser fiziologic NaCl 9‰ preparat cu apă bidistilată sau tampon veronal). În primul și al doilea tub se pun cîte 0,50 ml din diluția de antigen 1/10 dinainte preparat. Se barbotează suspensia din eprubeta a doua și din această diluție se trec 0,50 ml în eprubeta a 3-a. Se procedează întocmai pentru celelalte eprubete pînă la eprubeta a 8-a inclusiv. Din această eprubetă, după barbotare, se elimină 0,50 ml. În felul acesta s-au realizat diluțiile: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160... 1/1 280.

Se adaugă în fiecare tub, inclusiv eprubeta nr. 9 în care nu s-a pus antigen și care este martorul pentru hematii, cîte 0,25 ml din suspensia de hematii 0,50% (vezi tabelul 157).

TABELUL 15

Schema reacției de hemaglutinare

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9 (martor)
Antigen diluție ml	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280	
Suspensii hematii 0,50 % ml	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,25
Lichid diluant ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,50

90 de minute la temperatura laboratorului

Se agită bine eprubetele şi sistemul astfel realizat se lasă în repaus la temperatura camerii timp de o oră şi jumătate, după care se citeşte rezultatul reacţiei [1]. Citirea se face cu uşurinţă cu ajutorul unei oglinzi plasate sub stelaj.

În eprubetele martore, ca şi în cele în care reacţia este negativă, hematiile sedimentează sub forma unui disc roşu, sau a unui mic colac cu marginile perfect regulate. În eprubetele în care hemaglutinarea s-a produs, se constată un depozit granulos, roz-cenuşiu sau o depunere a hematiilor sub formă de stea sau de colac cu margini neregulate, pulverulent. Lichidul supernatant este limpede, incolor (fig. 521).

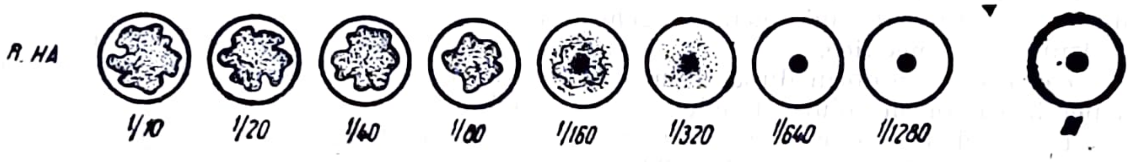


Fig. 521. — Aspectul schematic al unei reacţii H.A. pozitive.

De reţinut că în cazul virusurilor urliene sau hepatitice în eprubetele pozitive se observă şi un grad mai mic sau mai mare de hemoliză.

În aprecierea reacţiei, *diluţia ultimei eprubete pozitive stabileşte titrul hemaglutinant*; ea conţine o doză hemaglutinantă.

Între tuburile intens pozitive şi cele negative se pot constata aspecte intermediare. Un grad de hemaglutinare intens pozitiv se notează cu +++; cu ++ se notează un aspect mai puţin intens, cu + o hemaglutinare slab pozitivă şi cu ± tuburile cu aspect dubios.

Reacţia — după cum s-a mai precizat — poate fi executată convenabil pe plăci de sticlă, porţelan sau material plastic cu godeuri.

Metoda este foarte bună, în special cînd se lucrează în serie, citirea putîndu-se face mult mai rapid. În efectuarea reacţiei pe plăci de un real folos sînt pipetele şi seringile automate, care simplifică şi mai mult tehnica.

O modificare ingenioasă a metodei de hemaglutinare pe plăci a adus-o Gy Takatsy, care înlocuieşte pipeta gradată cu anse spiralate de metal, calibrate, ce reţin 0,25 ml şi care realizează diluţiile de antigen direct în suspensia de hematii.

Introducînd plăcile Takatsy, după realizarea diluţiilor, într-o centrifugă lentă (700—1 000 turaţii/min.), adaptată special, se poate citi rezultatul hemaglutinării după 4—5 minute.

★

În interpretarea rezultatelor reacţiei de hemaglutinare va trebui permanent să ţinem seama de unele posibilităţi de eroare.

Trebuie avut în vedere că proprietatea hemaglutinantă nu este strict specifică inframicrobilor. S-a putut dovedi că aglutinarea eritrocitelor poate fi în anumite condiţii produsă şi de unele bacterii sau ciuperci, de unii compuşi organici (acizi aminaţi, lipoizi, acizi graşi etc.), precum şi de unele săruri metalice.

Din această cauză hemaglutinările pozitive obţinute cu produse patologice (spută, lichid de spălătură nazo-faringiană, fecale etc.), în care trebuie identificat virusul, vor trebui obligatoriu supuse inhibării cu seruri cunoscute, hemaglutino-inhibante.

Identificarea unui virus prin hemaglutinare nu are valoare decît după obţinerea hemaglutinoinhibării cu serul specific.

— În cazul obţinerii unor rezultate negative, mai ales cînd se foloseşte ca antigen saliva, lichidul de spălătură nazo-faringiană etc., trebuie ţinut seama şi de existenţa unor elemente inhibitorii nespecifice prezente în aceste produse.

— Nu trebuie de asemenea uitat că în special în cazul virusurilor ale căror hemaglutinine sînt legate intim de particula virotică, fenomenul de aglutinare are loc în conformitate cu legea maselor şi că este posibil ca unele rezultate negative să fie datorite faptului că deşi prezenţi, corpusculii virotici se găsesc într-o cantitate mult prea mică pentru a produce aglutinarea eritrocitelor; în aceste cazuri, se impune concentrarea aglutininelor.

În sfîrşit, trebuie cunoscut că unele virusuri produc hemaglutinarea numai în anumite condiţii.

Astfel, virusul encefalitei B produce hemaglutinarea numai la pH = 6,5—6,8, cel al encefalitei de primăvară-vară la pH = 7,5, germenii ornitozici aglutinează hematiile de şoarece numai la 37° etc.

---

[1] Momentul citirii reacţiei este în funcţie de virus, hematii şi temperatură. Citirea se face numai după ce hematiile s-au depus perfect în tubul martor.

Inhibarea hemaglutinării

Inhibarea hemaglutinării reprezintă faza cea mai importantă din reacţia Hirst.

Ea oferă pe de o parte posibilitatea identificării unui virus hemaglutinant, pe de altă parte stabileşte diagnosticul unei viroze prin evidenţierea anticorpilor specifici hemaglutino-inhibanţi.

În primul caz, al identificării unui virus hemaglutinant, se folosesc seruri cu proprietăţi inhibante perfect stabilite.

Se folosesc fie seruri preparate în laborator, fie seruri recoltate de la bolnavi sau convalescenţi şi stocate în laborator.

În practica curentă, prepararea serurilor hemaglutino-inhibante se face pe iepure, dihor şi mai ales pe cocoş.

Tehnica preparării serurilor hemaglutino-inhibante variază după fiecare virus în parte; ea este în consecinţă descrisă la capitolul respectiv.

O dată preparate, serurile se diluează cu soluţia fiziologică de NaCl 9 °/₀₀ în proporţie de 1/10 şi inactivate prin menţinere timp de 30 de minute la + 56°. Se adaugă mertiolat de sodiu sau potasiu în proporţie de 1/10 000 şi apoi sînt fiolate, etichetate şi conservate la —30°. În lipsa unui congelator, serurile pot fi menţinute la + 4° în bune condiţii, dar cu o durată de valabilitate mai scăzută. O valabilitate îndelungată a serurilor inhibante se poate obţine prin liofilizare.

Deoarece uneori se poate constata în anumite seruri umane sau animale şi chiar în cele preparate în laborator, pe iepure sau pe dihor, existenţa unor inhibitori nespecifici termostabili, laboratorul de diagnostic virusologic va trebui să posede, fie filtrate de vibrion holeric, fie o soluţie de periodat de K, fiind cunoscută proprietatea acestora de a distruge astfel de inhibitori.

In cazul folosirii *filtratului de vibrion holeric*, serul, după inactivare 30 minute la 56°, va fi pus în contact cu enzima vibrionului holeric în proporţie de o parte ser la 4 părţi filtrat şi se va menţine 12 ore la + 37°. După acest timp, amestecul va fi încălzit 60 de minute la 56°; în acest mod, activitatea enzimatică este anulată.

Rezultate foarte bune se obţin însă prin folosirea *soluţiei de periodat de K*, M/100, proaspătă.

Tehnica este simplă:

0,2 ml ser de bolnav se pun în contact cu 0,4 ml din soluţia de periodat. Amestecul se menţine 24 de ore la 37°. După acest interval se adaugă 0,4 ml sol. 5% glucoză pură. Se lasă la temperatura camerei 30—50 de minute, după care serul astfel pregătit se foloseşte în reacţia de hemaglutinoinhibare, după tehnica obişnuită.

Tehnica reacţiei de inhibare a hemaglutinării. S-au descris mai multe tehnici pentru reacţia de hemaglutinoinhibare, toate avînd la bază principiul de a se pune în contact serul specific cunoscut sau necunoscut (în diluţii crescînde) cu antigenul (în diluţie fixă) şi adăugarea, după 15—30 de minute, a unei cantităţi egale din suspensia de hematii.

Cînd în ser se găsesc anticorpi inhibanţi specifici faţă de hemaglutininele din antigen, acestea sînt neutralizate şi aglutinarea hematiilor nu va mai avea loc.

Se întrebuinţează o diluţie constantă de antigen şi anume cu un titru de 4—8 ori mai concentrat decît titrul ultimei eprubete pozitive din reacţia de titrare a antigenului (de exemplu, titrul maxim hemaglutinant fiind 1/640, se lucrează cu diluţia de antigen de 1/160 sau 1/80).

Reacţia se practică în 9 tuburi de hemoliză perfect curate, aşezate în stelaj. Se pipetează în fiecare eprubetă, cu excepţia primului tub, cîte 0,25 ml lichid diluant. În primul şi al doilea tub se pun cîte 0,25 ml din diluţia de ser 1/10 dinainte pregătit (serul utilizat trebuie să fi fost în prealabil inactivat 30 de minute la 56° sau pregătit cu periodat de K sau filtrat de vibrion holeric). Se barbotează suspensia din eprubeta a doua şi din această suspensie se trec 0,25 ml în eprubeta a 3-a. Se procedează întocmai pentru celelalte eprubete, pînă la eprubeta nr. 8 inclusiv. Din această eprubetă, după barbotare, se aruncă 0,25 ml. În felul acesta, în primele 8 tuburi s-au realizat diluţiile de ser: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80... 1/1 280.

Se adaugă în fiecare tub, inclusiv eprubeta nr. 9 (martorul pentru antigen), cîte 0,25 ml din diluţia constantă de antigen (4—8 unităţi hemaglutinante); se agită şi se lasă în repaus timp de 15—30 de minute, la temperatura laboratorului.

TABELUL 158

Schema reacției de hemaglutinoinhibare

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9*	10**
Ser inactivat diluție	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280	—	—
ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25		
Antigen (4–8 unități hemaglutinante) ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	—
Diluant în ml	—	—	—	—	—	—	—	—	0,25	0,50
Agitare; 15 minute la temperatura laboratorului										
Suspensie hematii 0,5 % în ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agitare; 90 de minute la temperatura laboratorului										

* Martor antigen
** Martor hematii

După acest timp se adaugă în toate 9 tuburi, precum și într-un al 10-lea tub în care în prealabil s-au introdus 0,50 ml lichid diluant (martor hematii) cîte 0,25 ml din suspensia de hematii 0,50%, se agită puternic și rezultatul se citește după același sistem tot după un repaus de $1^1/_2-2$ ore, la temperatura camerei (vezi tabelul 158).

Rezultatul reacției de inhibare arată un aspect invers aceluia din titrarea antigenului: în tubul martor și în tuburile în care inhibarea nu s-a produs, se observă aspectul de hemaglutinare, în timp ce în tuburile în care anticorpii serici au blocat acțiunea hemaglutinantă a virusului, se observă un mic disc sau colac roșu cu margini pefect regulate, asemănător cu acela din tuburile negative din faza titrării.

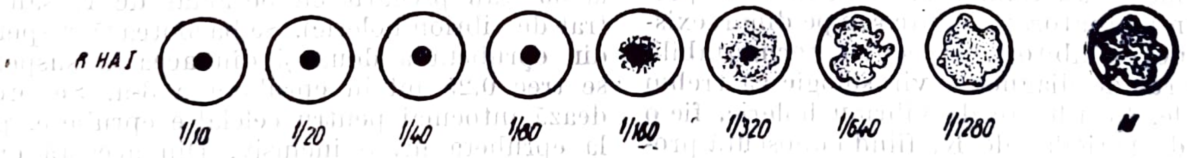


Fig. 522. — Aspectul schematic al unei reacții H.A.I. pozitive.

Rezultatul reacției de hamaglutinoinhibare este exprimat prin diluția ultimului tub în care hemaglutinarea a fost împiedicată să se producă (fig. 522).

În cazurile în care serul este elementul necunoscut de diagnosticat și, în care, în reacția de hemaglutinoinhibare, se obține un titru pozitiv mic (sub 1/80), reacția trebuie repetată; creșterea ulterioară a titrului inhibant va permite precizarea diagnosticului.

Reacția de hemaglutinare indirectă

În ultimii ani, cercetătorii își pun speranțe în reacția de hemaglutinare indirectă (pasivă). Este vorba de aglutinarea sub acțiunea serului specific a unor hematii în prealabil sensibilizate cu formol sau acid tanic și menținute în contact cu virusul respectiv. În cazul reacției de hemaglutinare pasivă (indirectă), hematiile tanate sau formolate ar juca rolul de „transportor" de virus.

Metoda a fost folosită pentru virusurile urliene și Newcastle, încă din 1946, de către Burnet și Anderson.

Recent, ea a fost recomandată pentru decelarea anticorpilor antiadenovirotici (Friedman și colab.), antiherpetici (Scott și colab.), antipoliomielitici (McKenna și colab.), antiornitozici (Benedict și colab.) etc.

În cercetările comparative efectuate de unii autori, hemaglutinarea indirectă a furnizat rezultate superioare altor reacții serologice; este de altfel și motivul pentru care am considerat util să o cităm.

REACȚIA DE AGLUTINARE LA RECE

Reacția cunoscută sub numele de „aglutinare la rece'' are ca scop punerea în evidență în serul sanguin a unor aglutinine speciale care aglutinează hematiile proprii sau cele de grup 0 (auto- și izoaglutinare), numai la temperaturi joase (+4°). Aceste aglutinine, *crioaglutininele*, sînt total diferite de hemaglutininele care intervin în reacția Hirst.

Crioaglutininele semnalate pentru prima oară în 1903 de K. Landsteiner au fost studiate amănunțit începînd din 1943, cînd Turner și colab. le găsesc frecvent în cazuri de pneumonie atipică.

În ultimii ani, reacția este considerată ca una dintre cele mai folositoare metode de diagnostic în unele pneumonii inframicrobiene, deși este departe de a fi specifică. Într-adevăr, în afară de faptul că nu este prezentă decît în 50—60% din cazuri (în funcție de gravitatea bolii), reacția poate fi pozitivă și în alte afecțiuni ca: anemia hemolitică, malarie, sifilis, hepatite epidemice, ciroze, leucemii, gripă, rujeolă, rubeolă, mononucleoză infecțioasă etc. și, rareori, chiar la omul normal.

Cu toate acestea, studiul în dinamică al titrului crioaglutininelor poate furniza date extrem de prețioase care, coroborate cu alte rezultate, pot preciza diagnosticul unora din pneumoniile primare inframicrobiene.

Materialul necesar (pentru fiecare ser de diagnosticat):

- stativ de metal pentru 22 de eprubete;
- 24 de eprubete, 65×10;
- 2 eprubete de centrifugă;
- 3 pipete de 1 ml, divizate în sutimi;
- 2 pipete de 5 ml;
- soluție fiziologică de NaCl $9^{0}/_{00}$;
- citrat de Na, $3{,}8^{0}/_{00}$;
- 2 seringi a 2 ml;
- ace intravenoase;
- garou.

Recoltarea produselor necesare. Se recoltează de la bolnavul de cercetat, cu o seringă sterilă, în care se află 0,4 ml citrat de Na $3{,}8^{0}/_{00}$, 2 ml sînge venos și apoi, fără să se scoată acul din venă, se înlocuiește prima seringă cu a doua, perfect uscată, în care se aspiră de asemenea 2 ml. Conținutul fiecărei seringi este deșertat în cîte o eprubetă.

Eprubeta care conține sîngele citratat este introdusă pentru 30 de minute într-o baie de apă sau termostat la 37°, în timp ce eprubeta a 2-a este menținută la temperatura camerei pentru a exprima serul.

Prepararea hematiilor pentru autoaglutinare. Sîngele citratat recoltat de la bolnavul de cercetat și care, după cum am văzut mai sus, este introdus la 37°, este după o jumătate de oră centrifugat timp de 10 minute, la 1 500 turații/min.

Se înlocuiește plasma cu același volum de soluție fiziologică NaCl $9^{0}/_{00}$, se agită ușor și eprubeta se introduce în baia de apă la 37°, timp de 15 minute. Se centrifughează din nou, repetîndu-se această operație de spălare a hematiilor de 3 ori, avînd grijă ca după fiecare înlocuire a soluției fiziologice să se mențină amestecul la 37°, timp de 15 minute.

După a 3-a spălare se face o suspensie 0,5% în soluție fiziologică de NaCl $9^{0}/_{00}$.

Prepararea hematiilor pentru izoaglutinare. Hematiile recoltate de la un donator universal (grup 0) pe citrat de Na $3{,}8^{0}/_{00}$, în aceeași proporție ca mai sus, de preferință cu 24 de ore—4 zile mai înainte [1], sînt spălate în momentul întrebuințării de 3 ori în soluție fiziologică de Na Cl $9^{0}/_{00}$ după schema descrisă mai sus pentru hematiile proprii.

După ultima spălare se prepară o suspensie 0,2% în soluție fiziologică.

Tehnica reacției. Într-un stativ se pun două rînduri de cîte 10 eprubete. Se notează rîndul I cu A (autoaglutinare) și rîndul al II-lea cu I (izoaglutinare). Cu excepția primei eprubete din fiecare rînd, în toate celelalte eprubete se pun cîte 0,5 ml soluție de NaCl $9^{0}/_{00}$.

În prima și a doua eprubetă din fiecare rînd se pipetează cîte 0,5 ml din diluția 1/5 a serului de cercetat inactivat și apoi din a 2-a eprubetă, după barbotare, se trece în a 3-a eprubetă 0,5 ml. Se continuă trecerile succesive, obținîndu-se astfel diluții crescînde de ser: 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1 280 și 1/2 560.

Se adaugă apoi în fiecare eprubetă din rîndul I (A) cîte 0,5 ml din suspensia de hematii proprii, iar în fiecare eprubetă din rîndul al II-lea (I) cîte 0,5 ml din suspensia de hematii grup 0.

Pentru fiecare rînd se adaugă cîte o eprubetă care conține 0,5 ml soluție fiziologică de NaCl $9^{0}/_{00}$ și cîte 0,5 ml suspensie hematii (martori hematii), care în mod normal nu trebuie să aglutineze.

---

[1] Hematiile pot fi folosite 10—14 zile dacă sînt conservate în lichidul Alsever.

Se agită bine și apoi stelajul se pune la gheţar la + 4° pentru 12—18 ore.

Citirea reacției. După trecerea acestui timp, stelajul se scoate fără a-l agita din gheţar și citirea se face repede, cu ochiul liber.

Subliniem necesitatea de a se examina imediat eprubetele, deoarece, la temperatura camerei, fenomenul de crioaglutinare poate dispărea adesea după scurt timp.

Se examinează întîi eprubetele martore, care după o ușoară agitare (care se realizează cel mai bine prin două bobîrnace la extremitatea inferioară a eprubetei) trebuie să prezinte o suspensie omogenă de hematii.

În tuburile în care aglutinarea s-a produs, se constată după același tip de agitație prezența de agregate de hematii mai mult sau mai puțin compacte. Acestea se apreciază cu cifrele 4, 3, 2, 1, 0.

Astfel, cu 4 se notează tubul în care după lovirea eprubetei depozitul de hematii se detașează total, puternic agregat; cu 3 cînd depozitul se desface în 2—3 fragmente compacte; cu 2 cînd se fragmentează în mai multe agregate mici; cu 1 cînd aspectul de agregare este extrem de fin, de cele mai multe ori decelabil numai cu lupa și cu 0, negativ, cînd amestecul se desface total ca în eprubetele martor.

Se consideră reacții pozitive cele în care aglutinarea este superioară diluției de 1/40.

În scopul unui control al reacției se introduc tuburile pozitive, pentru 30 de minute, într-o baie de apă sau termostat la 37°. În aceste condiții, aglutinarea dispare, ea putîndu-se produce din nou la rece.

REACȚIA DE HEMAGLUTINARE HĂNGĂNUȚIU-PAUL-BUNNELL-DAVIDSOHN (reacția H.P.B.D.)

Diferită de reacția Hirst, reacția Hăngănuțiu-Paul-Bunnell-Davidsohn, cunoscută mai ales sub numele de reacția Paul-Bunnell-Davidsohn, este folosită curent pentru diagnosticul mononucleozei infecțioase.

Reacția se bazează pe punerea în evidență în serul bolnavilor a unor aglutinine antioaie care prezintă în același timp particularitatea de a putea fi adsorbite pe un extract de hematii de bou, fără a putea fi însă adsorbite pe extractul de rinichi de cobai.

Reacția comportă două faze: una cantitativă (evidențierea aglutininelor antioaie) și o alta calitativă (identificarea aglutininei prin adsorbție comparativă). Reacția este pozitivă în majoritatea cazurilor de mononucleoză infecțioasă, dar și în unele rare cazuri de hepatită epidemică, leucemie, scarlatină etc.

Principiul reacției este deci bazat pe existența unor hemaglutinine serice antioaie capabile de a fi adsorbite total pe un extract de hematii de bou, dar neadsorbabile pe extractul de rinichi de cobai.

Elementele necesare reacției sînt:

— hematii de berbec;
— extractul de hematii de bou;
— extractul de rinichi de cobai;
— serul de diagnosticat.

Dăm pe scurt modul cel mai simplu de preparare al acestor reageni.

Hematiile de berbec recoltate în mod obișnuit pe perle de sticlă, se folosesc, după spălare obișnuită, suspendate în soluție fiziologică de NaCl $8{,}5^0/_{00}$, în concentrație de 2%.

Extractul de hematii de bou. Se recoltează sînge de bou pe perle de sticlă și se defibrinează. După spălare obișnuită prin centrifugare de 2 — 3 ori în soluție fiziologică de NaCl $8{,}5^0/_{00}$, se face o suspensie 20% în ser fiziologic. Suspensia menținută într-un balon în care s-au introdus și cîteva perle de sticlă, se încălzește progresiv într-o baie de apă, pînă la temperatura de fierbere a apei, temperatură la care se

TABELUL 159

Schema reacției de aglutinare la rece

Tub nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 (martor hematii)
Ser de diagnosticat	diluție	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	—
	ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Suspensie 0,5% hematii proprii, în ml		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lichid diluant, în ml		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,5

Agitare; 12—18 ore la +4°.

TABELUL 169 bis

Schema reacției de izoaglutinare

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 (martor hematii)
Ser de diagnosticat: diluție	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	—
Ser de diagnosticat: ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Suspensie 0,5% hematii grup 0 în ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lichid diluant, în ml	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,5

Agitare; 12—18 ore la +4°.

menține timp de o oră. Se lasă să se răcească, se completează cantitatea de lichid pierdută prin evaporare cu apă distilată, și apoi se fenolează 0,5%. Extractul se conservă la ghețar la +4°, avînd o valabilitate de 2 — 3 luni.

Extractul de rinichi de cobai. Rinichii recoltați imediat după sacrificarea cobailor (se folosesc de obicei 4 — 5 cobai), sînt forfecați, triturați cu nisip de mare și emulsionați în 4 volume de soluție de NaCl $8{,}5^0/_{00}$. Emulsia astfel obținută se introduce într-un balon care este încălzit progresiv în baia de apă, pînă la temperatura de fierbere a apei, temperatură la care se menține timp de o oră. Se lasă să se răcească, se completează cu apă distilată cantitatea de lichid pierdută prin evaporare și apoi se fenolează 0,5%. Se conservă la ghețar la +4°, avînd o valabilitate de 3 luni.

Serul de diagnosticat se obține din sîngele recoltat steril prin puncție venoasă. Se menține la ghețar la +4°, *neinactivat.*

Tehnica reacției. Reacția se face în doi timpi: *a*) punerea în evidență a hemaglutininelor antioaie și *b*) identificarea lor.

Prima fază o constiuie *reacția de prezumție*, pozitivitatea ei condiționînd efectuarea celei de a doua faze, *reacția calitativă*, reacția de diagnostic propriu-zisă.

Reacția de prezumție se execută în bune condiții după tehnica preconizată de W. Moloney și E. Malzone. Se pune în contact pe o lamă de sticlă perfect curată, o picătură de sînge defibrinat de berbec și 3 picături de ser de bolnav, *neinactivat.* Se agită prin înclinarea lamei și se urmărește producerea hemaglutinării, care are valoare de pozitivitate numai cînd se produce într-un interval de timp ce nu depășește un minut.

O reacție pozitivă indică efectuarea celei de a doua probe, proba calitativă.

Reacția calitativă se execută comod după tehnica lentă preconizată de I. Davidsohn.

Materialul necesar:

- eprubete hemoliză;
- stelaje (10 orificii);
- pipete de 10, 5 și 1 ml, gradate în 0,1 ml;
- extract de hematii de bou;
- extract de rinichi de cobai;
- suspensie de hematii de berbec 2%;
- soluție fiziologică NaCl $8{,}5^0/_{00}$;
- centrifugă obișnuită.

Într-un stelaj se așază în trei rînduri cîte 9 tuburi de hemoliză. *Rîndul I*, notat cu A, este destinat probei cantitative; *rîndul al II-lea* notat cu B, este destinat probei de adsorbție pe extractul de hematii de bou; *rîndul al III-lea*, notat cu C, este destinat probei de adsorbție pe extractul de rinichi de cobai.

Separat se prepară trei tuburi: a, b și c. *În tubul a* se pipetează 0,8 ml soluție fiziologică de NaCl $8{,}5^0/_{00}$; *în tubul b*, 0,8 ml din extractul de hematii de bou, iar *în tubul c*, se introduc 0,8 ml din extractul de rinichi de cobai.

Se adaugă în fiecare din aceste tuburi cîte 0,2 ml din serul de diagnosticat, în prealabil inactivat 30 de minute la 56°. Se obține astfel în fiecare eprubetă diluția de ser 1/5. Se agită tuburile și se lasă la temperatura camerii timp de 30 de minute. În acest timp, se pipetează în toate cele 3 rînduri de eprubete A, B și C, cu excepția primului tub din fiecare rînd, cîte 0,25 ml lichid diluant.

După 30 de minute, tuburile *a*, *b* și *c*, se centrifughează timp de 10 minute la 1 500 turații/min.

Din supernatantul *a* se aspiră 0,50 ml și se distribuie în primele 2 eprubete din seria A (cîte 0,25 ml). Din eprubeta nr. 2, după barbotare, se aspiră 0,25 ml și se trec în eprubeta nr. 3, repetîndu-se procedeul pînă la eprubeta nr. 9. Din această ultimă eprubetă, după barbotare, se elimină 0,25 ml. S-au realizat astfel diluții crescînde de ser inactivat (1/5, 1/10, 1/20, 1/40 ... 1/1280).

Din supernatantul tubului *b* se aspiră 0,50 ml și se distribuie în primele două eprubete din seria B (cîte 0,25 ml). Din eprubeta nr. 2, după barbotare, se aspiră 0,25 ml lichid și se trece în eprubeta nr. 3, repetîndu-se operația pînă la eprubeta nr. 9. Din această ultimă eprubetă, după barbotare, se elimină 0,25 ml. S-au realizat astfel diluții crescînde de ser inactivat, după adsorbția pe extractul de hematii de bou.

Din supernatantul tubului *c*, cu o altă pipetă, se distribuie în primele 2 eprubete din seria *C*, cîte 0,25 ml. Din eprubeta nr. 2, după barbotare, se aspiră 0,25 ml și se amestecă cu cei 0,25 ml lichid diluant din eprubeta nr. 3. După barbotare, se trec 0,25 ml în eprubeta nr. 4 și așa mai departe, pînă la eprubeta nr. 9. Surplusul de 0,25 ml din această ultimă eprubetă se îndepărtează. S-au realizat astfel și diluții crescînde de ser inactivat, după adsorbție pe extractul de rinichi de cobai.

Într-un timp următor, se adaugă în toate eprubetele din rîndurile A, B și C cîte 0,1 ml din suspensia de hematii de berbec 2%. Se agită energic și se lasă în repaus la temperatura camerii (vezi tabelele 160 — 162).

TABELUL 160

Schema reacției Hăngănuțiu-Paul-Bunnell-Davidsohn Seria A. Titrarea hemaglutininei

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ser de diagnosticat inactivat diluția	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Suspensie hematii de berbec 2% ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Agitare: se lasă 18—24 de ore la temperatura laboratorului.

TABELUL 161

Schema reacției Hăngănuțiu-Paul-Bunnell-Davidsohn Seria B. Adsorbția pe extractul de hematii de bou

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ser de diagnosticat inactivat după 30 de minute contact cu extractul de hematii de bou diluția	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Suspensie de hematii de berbec 2% în ml	0,1	0,1	0.1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Agitare: se lasă 18—24 de ore la temperatura laboratorului.

TABELUL 162

Schema reacției Hăngănuțiu-Paul-Bunnell-Davidsohn Seria C. Adsorbția pe extractul de rinichi de cobai

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ser de diagnosticat inactivat, după 30 de minute contact cu extractul de rinichi de cobai diluția	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280
ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Suspensie hematii de berbec 2%, în ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Agitare: se lasă 18—24 de ore la temperatura laboratorului.

Citirea reacției se face la fiecare 30 de minute, rezultatul stabilindu-se la 2 ore și definitivîndu-se la 18 — 24 de ore, cînd aglutinările devin evidente.

Rezultatele se notează cu cifre de la 1 — 4. O aglutinare fină, vizibilă cu lupa se notează cu 1; o aglutinare în grunji mai mari într-un lichid ușor opalescent se notează cu 2; cu 3 se notează o hemaglutinare în blocuri într-un lichid clar, iar cu 4 se notează aglutinarea masivă a hematiilor într-un bloc unic, greu disociabil.

Rezultatul negativ, caracterizat printr-o suspensie omogenă de hematii, după agitarea ușoară a depozitului, se notează cu 0. O reacție pozitivă arată prezența aglutinării în tuburile din seriile A și C și lipsa aglutinării în tuburile din seria B.

Spre exemplu, o reacție pozitivă la un titru de 1/320, caracteristică mononucleozei infecțioase s-ar nota astfel:

Seria A 444 332 200
Seria B 000 000 000
Seria C 444 332 200

De reținut că există și foarte rare cazuri cînd adsorbția pe extractul de hematii de bou nu se face 100%, ci 98%; aceasta în special cînd serurile au un titru hemaglutinant foarte mare.

Trebuie de asemenea cunoscut că la serurile vechi, contactul lor cu urme de acizi sau substanțe alcaline, ca și cu dopuri de cauciuc colorat sau chiar de plută, poate uneori furniza rezultate eronate.

REACŢIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI

Reacția descoperită de Bordet și Gengou, folosită cu atît de bune rezultate în diagnosticul de laborator a numeroase infecții bacteriene, a fost socotită pînă de curînd ca o probă biologică cu valoare discutabilă în inframicrobioze.

Tehnicile moderne de cultivare a virusurilor, descoperirea unor metode biochimice și biofizice de purificare a acestor germeni, deci și de preparare a unor antigene excelente, ca și modificările aduse tehnicii reacției, în special folosirea fixării prelungite la temperatură joasă (+4°), preconizată de Ginsburg și Kalinin, au făcut ca în ultimii ani reacția de fixare a complementului să redevină actuală în inframicrobiologie și să fie folosită curent în diagnosticul unor viroze.

La ora actuală, reacția de fixare a complementului permite fie identificarea unui virus necunoscut cu ajutorul serurilor standard, fie mai ales diagnosticul unor infecții inframicrobiene, prin evidențierea anticorpilor fixatori de complement în prezența unor antigene virotice cunoscute.

Gripa, oreionul, adenovirozele, coriomeningita limfocitară, encefalitele virotice, limfogranulomatoza venerică, psittacoza, febra „Q'', febrele exantematice și multe alte inframicrobioze umane și animale beneficiază astăzi din plin de această metodă.

Ca și în bacterioze, în domeniul inframicrobiozelor, reacția de fixare a complementului se bazează pe combinarea a două faze: a) formarea complexului antigen-anticorp cu fixarea alexinei și b) adăugarea sistemului indicator care conține la rîndul său un antigen (hematii de berbec) și un anticorp (ser hemolitic).

Ca și în cazul bacteriozelor, o reacție de diagnostic pozitivă va fi apreciată prin lipsa hemolizei, dovadă de fixarea alexinei (complementului) de complexul antigen-anticorp specific.

Principiul reacției fiind deci același, elementele care intervin în reacție sînt de asemenea aceleași: antigenul, serul specific, alexina, hematiile de oaie, serul hemolitic.

Datorită faptului că inframicrobii nu se pot cultiva pe medii obișnuite ca bacteriile, ci numai pe medii vii, și că în consecință antigenele se prepară din țesuturi parazitate, lichide embrionare etc., spre deosebire de reacția de fixare clasică, în cazul virozelor se adaugă în reacție un antigen „normal'' (țesutul sau lichidul embrionar normal similar cu cel pe care s-a cultivat virusul) și un ser de control.

În cele ce urmează vom da tehnicile cele mai simple de preparare a reagenilor și numai a acelora care — prin specificul lor — diferă de tehnicile bacteriologice obișnuite.

Prepararea antigenelor. În mod curent se folosesc antigene cu specificitate strictă și cu titru ridicat (pentru a se putea decela cantități foarte mici de anticorpi specifici), preparate din: țesuturi parazitate de inframicrobi după infecția experimentală sau naturală, diferite formații ale oului embrionat infectat experimental sau din virusurile cultivate în diferite celule *in vitro*.

Prepararea antigenelor din țesuturi parazitate de virusuri. Dintre numeroasele metode folosite, ne vom opri numai la cele care permit obținerea unor antigene purificate, ca și la cele care permit obținerea de antigene solubile.

Dintre tehnicile de preparare a unor antigene purificate, ne vom limita la tehnica Casals și la cea de preparare a antigenelor rickettsiene, tehnici valoroase, care pot fi realizate la nivelul laboratoarelor de diagnostic inframicrobiologic.

Tehnica Casals, utilizată în special pentru prepararea antigenelor din diverse neuroviroze, poate fi aplicată cu aceleași bune rezultate și în domeniul altor infecții inframicrobiene.

Fragmente de țesut infecțios sînt sfărîmate cu grijă în mojar sau de preferință într-un aparat Turmix cu 20 de volume acetonă rece (20 ml acetonă pentru fiecare gram de țesut).

— Centrifugare rapidă (1 – 2 minute, la 1 500 turații/min.), după care se îndepărtează lichidul supernatant.

— Se adaugă acetonă în aceeași cantitate ca la punctul 1, se agită bine și se lasă 20 de minute la temperatura camerei, după care se centrifughează 1—2 minute la 1 500 turații/min.

— Se îndepărtează lichidul supernatant, se înlocuiește cu un volum egal dintr-un amestec acetonă-eter etilic părți egale și se lasă 20 de minute la temperatura camerii, agitînd din cînd în cînd.

— Se centrifughează 1 minut la 1 500 turații/min., se înlătură supernatantul și se înlocuiește cu același volum (20/1) eter etilic anhidru, procedîndu-se ca mai sus.

— Se centrifughează 1—2 minute, la 1 500 turații/min, se înlătură supernatantul și sedimentul se usucă la vid (desicația completă se realizează în 15—20 de minute).

— Pudra obținută se suspendă în soluție fiziologică de NaCl 8,5‰ în proporție de 3 volume lichid la 1 g substanță (calculîndu-se la greutatea inițială), după care se lasă 30 de minute la temperatura camerei sau o noapte la gheţar la +4°.

— Se centrifughează o oră la 10 000 turații/min., după care se recoltează lichidul supernatant care constituie antigenul.

— Se adaugă mertiolat de Na sau K în proporție de 1/10 000 și se conservă la +4°.

— În momentul întrebuințării, antigenul va fi diluat 1/10.

Antigenele rickettsiene se prepară în mod obișnuit din rickettsiile cultivate în sacul vitelin al embrionilor de găină. Iată o tehnică simplă, preconizată de Institutul „Dr. I. Cantacuzino'':

— Se recoltează în mod steril sacul vitelin din ouăle embrionate infectate experimental și se triturează în mojar sau de preferință într-un aparat Turmix, după care, masei obținute i se adaugă 20 de volume soluție fiziologică de NaCl 8,5‰.

— Se adaugă formol neutralizat în proporție de 2‰ și suspensia obținută se menține la gheţar, la +4°, timp de 8 zile.

— Se trece suspensia într-o pîlnie de separație și se adaugă eter sulfuric în părți egale. Se agită puternic și apoi se lasă în repaus 24 de ore la +4°.

— După 24 de ore se recoltează cu atenție stratul apos din partea inferioară a pîlniei de separare și se centrifughează timp de 1 oră la 18 000 turații/min.

Lichidul supernatant recoltat va conține antigenul solubil (în cazul Rickettsiei prowazecki, comun pentru această rickettsie, cît și pentru Rickettsia mooseri), iar sedimentul constituit din corpii rickettsieni, resuspendat în 3—5 ml soluție fiziologică NaCl 8,5‰, va constitui antigenul corpuscular (specific pentru fiecare tip de rickettsie).[1]

După preparare, antigenele se mențin la întuneric și la +4° avînd o valabilitate de 3—4 luni.

Existența antigenelor solubile nu este însă limitată la rickettsii. Ele au fost obținute și în alte inframicrobioze: gripa, coriomeningita limfocitară, oreion etc.

Antigenele solubile se obțin ușor prin ultracentrifugare:

Se triturează în mojar sau în Turmix organul bogat în virus, se face o suspensie 10% în soluție fiziologică de NaCl 8,5‰, și se centrifughează 30 de minute la 18 000—20 000 turații/min. Lichidul superficial, antigenul solubil, va putea fi utilizat imediat în reacție. Se conservă cîteva luni la +4°.

Prepararea antigenelor din lichide și țesuturi embrionare. Deși lichidele alantoidiene și amniotice pot fi folosite ca antigene, ca atare se recomandă purificarea lor prealabilă.

O metodă mai simplă, propusă de Henle constă în dializa în saci de colodiu sau celofan contra unei soluții-tampon fosfat 0,11 M, pH 7, timp de 48 de ore, la +4°.

După acest timp, conținutul sacului este centrifugat timp de 5—10 minute la 3 000 turații/min. Supernatantul constituie antigenul care va putea fi folosit cu bune rezultate în reacție.

---

[1] De remarcat că se pot realiza reacții de diagnostic folosind ca antigen stratul apos necentrifugat, care conține atît antigenul solubil cît și cel corpuscular. Această metodă nu permite însă spre exemplu, diferențierea tifosului exantematic de tifosul murin, antigenul solubil fiind comun.

Conţinutul şi trituratul de sac vitelin, ca şi fragmentele de embrion, se folosesc după schema următoare :

— După triturare în mojar, se face o suspensie 20% în soluţie-tampon veronal.

— Congelare şi decongelare succesivă în amestec refrigerent (alcool—CO_2 solid), repetată de 6 ori.

— Centrifugare 30 de minute la 3 000 turaţii/min., cu recoltarea lichidului superficial care reprezintă antigenul şi care se conservă 5—6 luni la —30° sau 1—2 luni la +4° [1].

Prepararea antigenelor din culturi celulare. Ca antigene, în cazul cultivării virusurilor în culturi celulare, se folosesc însăşi mediile nutritive extrase din tuburile de cultură, în momentul în care se constată un maxim efect citopatic, o distrugere evidentă a stratului de celule.

Pentru debarasarea de celule şi resturi celulare este indicată o centrifugare de 10 minute la 1 500 turaţii/min. Lichidul superficial constituie antigenul pentru reacţia de fixare a complementului.

Prepararea antigenelor „normale". După cum s-a arătat, datorită specificului cultivării virusurilor, este necesară introducerea în reacţie şi a unor antigene martore, preparate din ţesuturi normale, lichide embrionare, medii nutritive din culturi neinfectate etc., în aceleaşi condiţii ca antigenele specifice.

Nici un rezultat serologic nu trebuie luat în consideraţie decît după eliminarea posibilităţii unei pseudoreacţii pozitive faţă de ţesutul în care germenul a fost cultivat.

Această precauţie trebuie urmată mai ales cînd se lucrează cu serul unor bolnavi luetici, care în mod obişnuit dau reacţii pozitive cu antigene preparate din ţesuturi embrionare normale.

Prepararea serurilor imune. Serurile imune „standard", cu un titru ridicat de anticorpi fixatori de complement, folosite fie pentru identificarea unui virus necunoscut, fie ca martori în reacţiile cu antigene cunoscute şi seruri de diagnosticat, pot fi de provenienţă umană (*seruri de convalescent*) sau *preparate în laborator*.

Serurile preparate pe animalele de laborator se obţin după mai multe tehnici, pe diferite specii de animale, mai frecvent pe cobai, cocoş, maimuţă, iepure, hamster etc., în funcţie de inframicrobul respectiv.

Tehnicile de preparare variază de la virus la virus, pentru fiecare germen existînd variate şi multiple tehnici. La capitolele speciale privind fiecare grup de inframicrobi vom indica tehnicile recomandate.

Serurile imune de om se recoltează steril în convalescenţa bolii respective. Momentul de elecţie pentru recoltare este în general situat între a 25-a şi a 30-a zi de la debutul bolii.

Independent de provenienţa lor, umană sau animală, după recoltare serurile, se diluează 1/2, se inactivează 20 de minute la 56°, se introduc în fiole sau flacoane bine închise şi se menţin la gheţar la +4° sau la temperaturi mai scăzute (—10 pînă la —30°). În aceste condiţii, serul poate fi utilizat 2—5 luni.

Se recomandă a nu se folosi serurile decît după cel puţin 24 de ore de la recoltare şi menţinere la gheţar.

Pentru evitarea unei eventuale proprietăţi anticomplementare, în special în cazul unei conservări prelungite, înainte de întrebuinţare, serurile vor fi reinactivate 20 de minute la +60°.

Pentru asigurarea sterilităţii se poate adăuga mertiolat de sodiu sau potasiu, în proporţie de 1/10 000.

În cazul în care serurile imune obţinute pe animale au fost preparate cu antigene tisulare eterologe sau chiar cînd au fost preparate cu ţesuturi omoloage şi dorim a înlătura cele mai mici urme de anticorpi antitisulari şi deci a reduce cît mai mult anticorpii nespecifici este indicat a folosi adsorbţia acestor anticorpi.

Iată o tehnică simplă propusă de Henle în acest scop :

Se pun în contact pentru 30 de minute la temperatura laboratorului părţi egale din serul inactivat cu o suspensie din ţesutul normal respectiv 10% în soluţie fiziologică de NaCl 8,5‰ sau cu o suspensie de hematii de oaie 10%.

Se centrifughează 10 minute la 3 000 turaţii/min., se recoltează steril supernatantul şi se foloseşte în reacţie.

Pregătirea serurilor de diagnosticat. Serurile de diagnosticat trebuie recoltate de la bolnavi în mai multe reprize : o primă recoltare la debutul bolii, o a doua la 7—10 zile şi, în sfîrşit, o a treia la 14—25 de zile de la debutul bolii. Aceasta, deoarece creşterea în timp a titrului anticorpilor fixatori de complement reprezintă un criteriu mult mai valabil pentru stabilirea diagnosticului, decît simpla existență a anticorpilor specifici.

---

[1] Pentru a se preîntîmpina unele infecţii accidentale de laborator, se recomandă ca antigenele cu germeni cu patogenitate crescută să fie formolate 0,5—2‰ sau iradiate cu raze ultraviolete.

Se recomandă ca reacția de diagnostic să se efectueze o dată pentru toate probele de sînge recoltate. Pentru aceasta, după recoltare, serul sanguin va fi inactivat 20 de minute la 56° și apoi conservat la gheţar; înainte de practicarea reacției serul se va reinactiva aceeași durată de timp, însă la 60°.

În caz că recoltarea nu s-a putut face în cele mai bune condiții de asepsie, se recomandă adaosul de mertiolat de sodiu 1/10 000.

Alexina se obține ca pentru cercetările bacteriologice.

Ea poate fi îndelung păstrată prin liofilizare (valabilitate pînă la un an) sau cu ajutorul unor soluții conservante (Richardson, Sonnenschein sau Ronchèse).

Metoda Richardson folosește trei soluții : A, B și C.

Soluția A :

Acid boric (H_3BO_3)	1,55	g
Soluție saturată de clorură de sodiu (NaCl)	100	ml.

Soluția B :

Sorbital ($C_6H_{14}O_6 + 1/2\ H_2O$)	9,55	g
Azidă de sodiu (NaN_3)	0,81	g
Soluție saturată de clorură de sodiu, pînă la	100	ml.

Soluția C :

Azidă de sodiu (NaN_3)	0,81	g
Soluție saturată de clorură de sodiu, pînă la	100	ml.

Pentru 8 ml complement se adaugă 1 ml din soluția A și cîte 0,5 ml din soluția B și C. Pentru lucru se diluează un mililitru din acest amestec cu 8 ml apă distilată și se obține în acest mod o diluție 1/10.

Metoda Sonnenschein folosește o soluție care conține la 100 ml apă distilată 12 g de acetat de sodiu și 4 g acid boric. La o parte complement se adaugă o parte din soluția indicată.

Metoda Ronchèse folosește o soluție de clorură de sodiu (64 g) și sulfat de ortoxichinoleină (0,25 g) în apă distilată 1 000 ml. La o parte complement se adaugă o parte și jumătate din soluție. În momentul folosirii, la un volum de complement astfel păstrat se adaugă 3 volume apă distilată; diluția finală de alexină este în acest mod de 1/10.

Serul hemolitic ce dă cele mai bune rezultate în reacția de fixare a complementului se prepară pe iepure. În mod obișnuit se folosește un ser cu un titru hemolitic mare, procurat din comerț, la noi în țară de la Institutul „Dr. I. Cantacuzino'' sau Institutul „Pasteur''.

Pentru lucru, serul hemolitic se diluează 1/100, după cum urmează :

— ser hemolitic	1	ml
— glicerină neutră	1	ml
— soluție cloruro-sodică izotonică	91	ml
— soluție 5% fenol	4	ml.

Astfel diluat, serul hemolitic poate fi păstrat minimum 3 luni la +4°.

Sistemul hemolitic se prepară prin amestecarea în părți egale a unei suspensii 3% hematii de berbec cu o diluție de ser hemolitic care conține 3 unități hemolitice. Sistemul se întrebuințează ca atare, fără a fi nevoie de sensibilizare la 37°.

Tehnica reacției. Executarea reacției de fixare a complementului pentru diagnosticul inframicrobiologic se poate face după mai multe tehnici, puțin diferite de cele folosite în diagnosticul diferitelor bacterioze, dar mai laborioase datorită unui număr mai mare de reacții paralele necesare pentru fiecare caz în parte.

Astfel, în cazul folosirii reacției pentru identificarea unui produs patogen în prezența unui ser imun, standard, este necesară efectuarea următoarelor probe separate :

— ser standard — produsul de identificat, nediluat ;

— ser standard — produsul de identificat, diluat 1/2 și 1/4 ;

— ser standard — antigen preparat din țesut sau lichid normal ;

— ser normal — produsul de identificat.

Pentru efectuarea reacției în viroze este necesară, ca de altfel și în R.F.C. din domeniul bacteriozelor, titrarea prealabilă a diverselor elemente care intervin în reacție (ser hemolitic, alexină, antigen, ser imun standard).

Titrarea alexinei se face după tehnicile obișnuite ale laboratorului clinic.

Titrarea serului hemolitic se face după tehnica indicată pentru fiecare viroză în parte, existînd mici diferențe față de tehnicile clasice.

Titrarea antigenului se poate face chiar imediat după preparare, titrul menținîndu-se de obicei în condiții optime de conservare, nemodificat o perioadă variabilă care diferă după fiecare agent inframicrobian în parte.

Titrarea se face în raport cu unul sau mai multe seruri imune standard, cu titruri cunoscute. Există însă cazuri în care laboratorul nu posedă seruri standard față de antigenul inframicrobian folosit. Cu toate că în acest caz tehnica reacției este mai complexă, ea nu este mult diferită, putîndu-se stabili ușor titrul antigenului și realiza o bună reacție de diagnostic. O dată antigenul titrat, el va servi și pentru titrarea serurilor standard.

Considerăm util să dăm tehnica titrării unui antigen în prezența unui ser standard cu titru cunoscut, ca și tehnica titrării unui antigen în lipsa unui ser standard titrat.

Titrarea unui antigen *în prezența unor seruri titrate* în prealabil, necesită efectuarea simultană a 2 serii de reacții (cu un ser sigur pozitiv și cu unul negativ).

În tabelul 163 este redată schema unei astfel de titrări.

De remarcat că după ce se pipetează în eprubete reagenii din prima parte a reacției, tuburile se agită bine și se introduc pentru o oră la 37° în baie de apă.

După acest interval, se adaugă sistemul hemolitic, se agită bine și tuburile se introduc din nou, pentru 30 de minute, la 37°.

TABELUL 163

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7*	8**
Antigen { diluția	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/2	—
Antigen { ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
Ser standard inactivat, intens pozitiv conținînd 8 unități în 0,25 ml sau negativ	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	—	—
Complement (2 unități în 0,50 ml)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Lichid diluant în ml	—	—	—	—	—	—	0,25	0,50
o oră la 37° în, baie de apă								
Sistem hemolitic în ml	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
30 de minute la 37° în baie de apă								

* Martor, putere anticomplementară a antigenului.
** Martor, sistem hemolitic.

Rezultatul titrării antigenului se apreciază prin diluția cea mai mare care mai permite o fixare totală a complementului. Aceasta este *unitatea antigenică*.

Titrarea unui antigen *în lipsa unor seruri titrate*, poate fi soluționată fie cu ajutorul unor seruri de convalescent de boală tipică, fie cu serul animalelor imunizate special.

Tehnica acestei titrări consistă în punerea în contact a diluțiilor crescînde de ser cu diluții crescînde de antigen, tehnică cunoscută sub numele de titrare în ,,tablă de șah''.

Astfel, testările se vor începe cu antigenul pur și apoi cu antigenul diluat 1/2 ,1/4, 1/8, 1/16.

Folosirea diluțiilor de antigen evită erorile prin ,,fenomenul de zonă''.

Schema unei astfel de reacții este indicată în tabelul 164.

Rezultatul titrării antigenului se apreciază prin diluția de antigen care fixează total complementul cu cea mai intensă diluție de ser.

Spre exemplu, dacă o fixare completă s-a produs cu diluția de antigen 1/4 și diluția de ser 1/128, în timp ce cu antigenul 1/8, fixarea s-a produs numai pînă la o diluție de ser de 1/64, se va considera titrul antigenului, ,,unitatea antigen'' = 1/4.

După stabilirea titrului antigenului, pentru mai multă siguranță, el va trebui testat și în raport cu un ser normal.

Titrarea serurilor imune ,,standard''. Serurile imune ,,standard'' fie de proveniență umană, fie preparate pe animal, trebuie titrate înainte de întrebuințarea curentă. Titrarea lor se face față de antigene ,,standard'' cu titruri cunoscute. În mod obișnuit se folosesc 2—4 unități antigenice (recomandăm lucrul cu 4 unități).

În același timp, pentru stabilirea specificității lor, serurile inactivate vor fi testate și față de antigene normale (extracte de țesut similar sau lichide embrionare, neinfectate).

Tehnica titrării unui ser este simplă (tabel 165).

TABELUL 164

Schema titrării unui antigen în prezența unui ser netitrat

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11**
Ser inactivat – diluție	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	—	
Ser inactivat – ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25		
Antigen brut sau diluat 1/2, 1/4, 1/8 etc. în ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	—
Complement (2 unități în 0,50 ml)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Lichid diluant în ml	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,25	0,50
	o oră la 37° în baie de apă										
Sistem hemolitic în ml	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	30 de minute la 37°.										

* Martor, putere anticomplementară a antigenului.
** Martor, sistem hemolitic.

TABELUL 165

Schema titrării unui ser imun în prezența unui antigen standard

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9*	10**
Ser inactivat – diluție	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/4	
Ser inactivat – ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	—
Antigen (4 unități în 0,25 ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	—	—
Complement (2 unități în 0,50 ml)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Lichid diluant, în ml	—	—	—	—	—	—	—	—	0,25	0,50
	O oră la 37° în baie de apă									
Sistem hemolitic, în ml	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	30 de minute la 37°.									

* Martor, putere anticomplementară a serului.
** Martor, sistem hemolitic.

Controlul serului față de ,,antigene normale'' se efectuează după o schemă asemănătoare.

Titrul serului se stabilește după ultima diluție de ser care izbutește să fixeze total complementul (lipsa hemolizei) în contact cu 4 unități antigenice. Titrul serului imun reprezintă ,,unitatea anticorp''.

În lipsa unui antigen standard titrat, titrarea serului se va face față de un antigen brut și diluat 1/2 și 1/4, după o schemă similară cu cea din tabelul 164.

Conservate în bune condiții, serurile își mențin nemodificat titrul timp îndelungat.

Tehnica reacției de diagnostic. Reacția propriu-zisă se face după tehnici asemănătoare cu cele folosite în domeniul bacteriozelor. Diferitele tehnici propuse diferă între ele fie prin volumul reagenilor folosiți, fie prin condițiile de apreciere a hemolizei (100% sau 50%). Dintre tehnicile propuse, preferăm cele cantitative cu aprecierea unei hemolize de 100%, iar dintre acestea recomandăm și descriem o tehnică care derivă din cea preconizată de Kölmer-Baerner, printre a căror avantaje se numără și cantitatea redusă de ser necesitată.

Materiale necesare :

— Stative de metal.

— 16 eprubete de hemoliză (pentru fiecare ser) + 3 (pentru martorii fiecărei serii).

— 12 eprubete 16×160 pentru diluții etc.

— Pipete gradate de 10, 5, 2 și 1 ml (pipetele de 1 ml gradate la 0,05 ml).

— Pipete Kahn (gradate 0,0125—0,125).

— Cilindru gradat de 100 ml.

— Baie de apă și termostat de 37°.

— Lichid diluant (soluție fiziologică Na Cl 8,5‰ sau tampon veronal).

— Alexină.

— Ser hemolitic.

TABELUL 166

Schema reacției de diagnostic

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7	8*	9**	10***
Serul de diagnosticat diluție	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/4		
ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	—	—
Antigen (4 unități în 0,25 ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	—	0,25	—
Complement (2 unități în 0,50 ml)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Lichid diluant, în ml	—	—	—	—	—	—	—	0,25	0,25	0,50
Agitare și apoi 1 oră la 37° în baie de apă										
Sistem hemolitic, în ml	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
30 de minute la 37°.										

* Martor, putere anticomplementară ser.
** Martor, putere anticomplementară antigen.
*** Martor, sistem hemolitic.
(Tuburile 9 și 10 reprezintă martori pentru o serie de reacții)

— Suspensii de hematii 1,5%.
— Antigen standard specific.
— Antigen „normal".

Tehnica reacției poate fi urmărită în tabelul 166 reagenii fiind introduși în eprubete, în ordinea indicată în această schemă.

Rezultatul reacției se apreciază în mod obișnuit în funcție de hemoliză. *Se consideră pozitive numai tuburile în care hemoliza este absentă.* Reacția are valoare bineînțeles numai cînd aspectul tuburilor martore este perfect (hemoliză totală în tuburile 8, 9, 10).

Nu trebuie niciodată uitat că pentru certitudinea diagnosticului este obligator controlul serurilor pozitive și față de *antigene normale.*

Tehnica de fixare a complementului la rece. Spre deosebire de tehnica obișnuită de fixare a complementului la 37°, se folosește astăzi din ce în ce mai mult, cu bune rezultate, fixarea prelungită la rece, la temperatura de +4°, introdusă în studiul inframicrobiozelor de către Ginsburg și Kalinin și apoi de Kölmer și Baerner, care i-au adus diferite modificări.

Metoda prezintă avantaje, permițînd depistarea unor mici cantități de antigen datorită contactului prelungit între antigen și anticorp la temperatură joasă.

În mod practic, în reacție, după punerea în contact a diluțiilor de ser cu antigenul și după adăugarea complementului, se menține sistemul astfel realizat, timp de 24 de ore la ghețar, la +4°. După acest timp, tuburile se introduc pentru 10 minute la 37° în baie de apă și apoi se adaugă sistemul hemolitic. Se agită bine și se țin apoi tuburile 30 de minute la 37°, după care se face citirea reacției, întocmai ca în reacția obișnuită.

Bazați pe principiul reacției la rece, Sohier și Esser au propus o *micrometodă* foarte avantajoasă, în special pentru cazurile în care atît serurile cît și antigenele sînt în cantitate redusă.

În această *micrometodă* se folosesc aceleași materiale ca în metoda obișnuită (se recomandă a se utiliza însă tuburi mai mici : 8 × 66 sau mai ales plăci cu godeuri)[1].

Deoarece micrometoda necesită 2 unități de complement în 0,1 ml, înainte de a descrie reacția propriu-zisă indicăm o tehnică mai simplă de titrare a complementului, tehnică care ușurează efectuarea reacției (tabelul 167).

Sistemul hemolitic se prepară după tehnica uzuală, ținînd însă seama de doza redusă (0,1 ml) necesară pentru fiecare tub, de concentrația mai mare a suspensiei de hematii (2%) și de numărul mic de unități hemolitice necesare (2).

Exemplu : avem nevoie de 10 ml sistem hemolitic, titrul serului hemolitic („unitatea hemolitică") fiind de 1/4 000. Lucrîndu-se cu 2

---

[1] Cele mai comode sînt plăcile executate din material plastic.

TABELUL 167

Schema titrării complementului pentru micrometodă

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Complement diluție	1/10	1/15	1/20	1/25	1/30	1/35	1/40	1/50	1/60	1/70
Complement ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Antigen ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Lichid diluant ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
60 de minute în baie de apă la 37°										
Sistem hemolitic, ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0.1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
30 de minute în baie de apă la 37°										

TABELUL 168

Schema tehnicii microreacției de diagnostic

Tub nr.	1	2	3	4	5	6	7*	VIII (Martori pentru o serie de reacții)	IX	X	XI
Ser de diagnosticat diluție	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/8				
Ser de diagnosticat ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	—	—	—	—
Antigen ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	—	0,05	0,05	—	—
Complement (2 unități în 0,1 ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	0,1	—
Lichid diluant ml	—	—	—	—	—	—	0,05	0,05	0,15	0,1	0,25
Agitare, menținere o noapte la ghețar la +4° și apoi 10 minute în baie de apă, la 37°											
Sistem hemolitic	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Suspensie hematii 2% nesensibilizate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,05
30 de minute la 37°											

* Martor putere anticomplementară a serului.
Tub VIII — Martor antigen.
Tub IX — Martor antigen fără complement.
Tub X — Martor sistem hemolitic.
Tub XI — Martor hematii.

unități hemolitice, respectiv cu diluția 1/2 000, vom utiliza pentru 10 ml sistem, 0,05 ml, din diluția ser hemolitic 1/10. În practică, se introduc într-un balon cu fund plat, 9,75 ml lichid diluant și apoi 0,20 ml din depozitul de globule spălate.

Se face o suspensie omogenă și apoi, cu o pipetă uscată, se introduc brusc cei 0,05 ml din diluția 1/10 ser hemolitic.

Se agită bine și apoi amestecul se menține 40 de minute la termostat, la 37°. După această pregătire, sistemul hemolitic se introduce în cantitatea recomandată, în tuburile de reacție.

Tehnica microreacției de diagnostic propriu-zisă este simplă. Ea poate fi urmărită pe tabelul 168.

De remarcat că în afară de diferențe cantitative, această micrometodă se deosebește de tehnica obișnuită și prin aceea că după primul timp al reacției, sistemul este menținut la ghețar la +4° și nu la 37°.

Rezultatul reacției se apreciază în mod obișnuit. *O reacție pozitivă este caracterizată prin absență totală a hemolizei.*

Ca și în cazul reacției normale, serurile pozitive trebuie obligatoriu testate și față de antigene „normale”. În același timp, antigenul folosit trebuie controlat cu un ser negativ și unul pozitiv.

★

Indiferent de tehnica de fixare a complementului folosită, aprecierea rezultatelor trebuie făcută cu atenție, ținîndu-se seama de anumite elemente.

Astfel, în cazul cercetării anticorpilor din serul unor bolnavi, diagnosticul va putea fi pus cu certitudine numai pe baza studiului dinamic al acestor anticorpi. Într-adevăr, prezența anticorpilor fixatori de complement nu este suficientă decît pentru a permite un diagnostic de prezumție. Posibilitatea imunizărilor oculte în decursul unor boli inaparente recente, existența anticorpilor anamnestici pot conduce adesea la erori. Din această cauză, pentru un diagnostic de certitudine trebuie decelată creșterea vizibilă a titrului acestor anticorpi în decursul bolii (diferență de minimum 2 diluții). Este deci necesară examinarea a cel puțin două probe de ser recoltate la distanță (prima la debutul bolii, o a doua în convalescență).

Creșterea titrului anticorpilor serici fixatori în decursul bolii sau, în caz că cele două probe de ser au fost luate tîrziu (spre sfîrșitul bolii și tîrziu în convalescență), scăderea acestora ne permite a preciza diagnosticul; aceasta bineînțeles și după ce ne-am asigurat că reacțiile martore cu „antigene normale'' sînt negative.

O altă posibilitate de aplicare a reacției de fixare a complementului este pentru *identificarea unui virus*.

În acest caz, laboratorul necesită pe lîngă seruri standard specifice și seruri normale, negative, ca și antigene normale de tipul produsului patogen. Reacțiile paralele cu aceste produse evită de asemenea erorile.

Nu trebuie uitat că în cazul reacțiilor, folosind ca antigen produse necunoscute, presupuse virulente, titrul va putea fi mai mic ca în reacțiile paralele cu antigene standard. Bogăția variată în virus a acestor produse este răspunzătoare de aceste diferențe. Nu trebuie de asemenea subestimat „fenomenul de zonă'', destul de des întîlnit. Din această cauză, produsele noi, de diagnosticat, folosite ca antigen, vor trebui testate atît sub formă brută, cît și diluate 1/2—1/4. În acest mod se vor evita erorile datorite unui exces de antigen.

REACȚIA DE NEUTRALIZARE

Reacția de neutralizare aplicabilă la toți inframicrobii care pot fi trecuți experimental pe animale sensibile, pe ouă embrionate sau culturi celulare este dintre reacțiile serologice cea mai mult aplicată în practica uzuală.

Principiul reacției consistă în a pune în contact, pentru o scurtă perioadă de timp, agentul inframicrobian cu un ser imun și inocularea ulterioară a acestui amestec în gazda sensibilă (animal, ou embrionat, cultură de celule).

În caz de reacție pozitivă, de neutralizare a inframicrobului, gazda va rezista inoculării (fapt care a dus și la denumirea de „test de seroprotecție''); într-o reacție negativă, animalul inoculat va face boala, dovedind astfel lipsa anticorpilor specifici cu acțiune neutralizantă față de inframicrobul respectiv.

Reacția permite fie identificarea unui inframicrob izolat dintr-un produs patogen, cu ajutorul serului imun de referință (aplicarea cea mai frecventă a metodei), fie decelarea anticorpilor dintr-un ser necunoscut în contact cu un antigen inframicrobian cunoscut și în acest fel diagnosticul unei inframicrobioze aparente sau inaparente, fie, în sfîrșit, stabilirea puterii protective a unui ser uman sau animal (titrarea serului).

Metoda este astăzi mult folosită și în cercetările epidemiologice referitoare la gradul de imunizare a unei populații față de un anumit germen inframicrobian.

Materiale necesare pentru o reacție de neutralizare care urmărește *diagnosticul sau titrarea unui ser*:

— o tulpină tip a inframicrobului respectiv prealabil titrată;

— serul de diagnosticat sau de titrat;

— gazda sensibilă (animalul de elecție, ouă embrionate sau culturi celulare), în funcție de inframicrobul respectiv.

Pentru o reacție care urmărește *identificarea unui inframicrob dintr-un produs patogen* sînt necesare:

— seruri specifice imune titrate;

— materialul virulent;

— gazda sensibilă (animalul de elecție, ouă embrionate sau culturi celulare), în funcție de inframicrobul respectiv.

Prepararea și titrarea materialului virulent. În reacția de identificare a unui ser se folosește ca material virulent o tulpină inframicrobiană cunoscută, un virus test, în prealabil titrat.

Se întrebuințează fie o suspensie preparată din organul cel mai bogat în germenii inframicrobieni respectivi, recoltat de la animalul sensibil, fie lichide embrionare (în cazul virusurilor adaptate la oul embrionat), fie, în sfîrșit, mediul nutritiv recoltat din culturile celulare infectate cu virusul respectiv.

Tulpina inframicrobiană test trebuie titrată în prealabil și conservată în cele mai bune condiții.

O bună conservare înlocuieşte, pentru majoritatea virusurilor, obligativitatea titrării cu regularitate a tulpinii înainte de executarea fiecărei reacții de neutralizare.

În cazul folosirii materialului virulent obținut de la animale de laborator se realizează o suspensie fină din organele bogate în virus, în lichidul diluant. Suspensia trebuie făcută riguros calculată, exact la greutatea de țesut, pentru a realiza o diluție finală de 1/5. Suspensia obținută se centrifughează 10 minute la 1 500 — 2 000 turații/min., după care lichidul superficial ce conține virusul se introduce în cantitate cunoscută în fiole şi se liofilizează (cu excepția virusurilor poliomielitice, *Coxsackie*, encefalitice) sau se conservă după congelare bruscă în frigidere de minus.

Paralel se realizează titrarea virusului, cunoscînd că în condiții optime de conservare (liofilizare, congelare), titrul suspensiei virulente rămîne nemodificat timp îndelungat.

În momentul efectuării reacției de neutralizare, materialul conservat se dezgheață (în cazul congelării) sau se resuspendă într-o cantitate de apă distilată egală cu cantitatea inițială (în cazul liofilizării) şi apoi se fac diluțiile de lucru în funcție de titrul virusului.

Titrul unui inframicrob reprezintă numărul de doze minime pe unitatea de volum (1 ml), care provoacă moartea sau leziuni caracteristice la un anumit procentaj din gazdele infectate (animale, embrioni, culturi celulare). În mod curent se determină doza care produce aspectul căutat la 50% din gazdele inoculate, rezultatul titrării exprimîndu-se în numărul de DL 50% (doze letale pentru 50% din animale) sau DIC 50% (doze infectante pentru 50% din culturi).

Metodele cele mai comode pentru stabilirea titrului sînt cea a *letalității cumulative* (Reed şi Muench) şi cea a lui Kärber.

În practică procedăm astfel:

Se realizează din suspensia virulentă o scară de diluții logaritmice (minimum 4). Din fiecare diluție se inoculează loturi de cel puțin 4 — 6 animale, ouă embrionate sau tuburi de culturi celulare (în funcție de inframicrobul respectiv).

Se urmăresc atent şi se notează animalele moarte cu simptome caracteristice, leziunile sau mortalitatea embrionilor, efectul citopatic în tuburile de cultură (în funcție de metoda folosită). Pentru o justă apreciere, animalele sucombate fără simptomatologie caracteristică vor fi studiate şi histopatologic.

Aprecierea rezultatelor titrării trebuie făcută cu multă scrupulozitate, căci diferențele date chiar de un singur animal, ou embrionat sau tub de culturi, luate în calcul, sînt destul de mari.

Dăm pentru exemplu, rezultatele titrării unui virus rabic de stradă pe şoarece.

TABELUL 169

Date cumulative ale titrării unui virus rabic de stradă

Diluția virusului	Numărul real al animalelor		Date cumulative		Letalitatea	
	Morți	Supraviețuitori	Morți	Supraviețuitori	Raport	%
10^{-2}	5	0	↑ 10	0	10/10	100
10^{-3}	4	1	5	1	5/6	83
10^{-4}	1	4	1	5	1/6	17
10^{-5}	0	5	0	10	0/10	0
10^{-6}	0	5	0	↓ 15	0/15	0

Rezultă că la diluția de virus rabic 10^{-4} a murit un şoarece, la diluția 10^{-3} 4 şoareci, iar la diluția 10^{-2} 5 şoareci din cei 5 inoculați.

Considerînd că şoarecele sucombat la diluția slabă 10^{-4} ar fi sucombat şi la diluțiile 10^{-3} şi 10^{-2} şi că de asemenea cei 4 şoareci morți la diluția 10^{-3} ar fi murit şi la diluția 10^{-2}, se adaugă numărul animalelor moarte la diluțiile mari de virus, la diluțiile mai mici. Se obține astfel *letalitatea cumulativă* şi respectiv prin acelaşi raționament *supraviețuirea cumulativă*.

Procentul de letalitate se calculează — după cum se vede — raportînd cifrele letalității cumulative la suma cifrelor care reprezintă letalitatea şi supraviețuirea cumulativă pentru fiecare diluție în parte.

Diluția care determină o letalitate de 50% (adică care conține 1 DL_{50}) se calculează ținînd seama că această diluție se află cuprinsă între diluția 10^{-3} (83% letalitate) şi diluția 10^{-4} (17% letalitate). Diluțiile 10^{-4} şi 10^{-3} sînt denumite *diluții critice*.

Cea mai simplă formulă de calcul pentru a obține DL_{50}, dată de Reed şi Muench, este următoarea:

$$\frac{\text{procentul letalității la cea mai mică diluție critică} - 50}{\text{procentul letalității la cea mai mică diluție critică} - \text{procentul letalității la cea mai mare diluție critică}}$$

sau, în exemplul nostru:

$$\frac{83 - 50}{83 - 17} = \frac{33}{66} = 0{,}50.$$

Această cifră, numită distanță proporționată, se adună fără a ține seama de semn la logaritmul diluției critice care a dat o mortalitate de peste 50%, realizînd astfel o corecție a acestei diluții.

Spre exemplu : în cazul nostru, DL_{50} se va găsi în diluția $10^{-3,50}$.

Pentru a stabili diluția de virus care conține o doză L_{50}, vom căuta în tabele antilogaritmul valorii astfel obținute.

Spre exemplu, în cazul nostru, $1\ DL_{50} = 10^{-3,50}$ este conținut de diluția 1/3 200 a suspensiei originale de virus.

O metodă mai simplă pentru calcularea titrului cu rezultate apropiate, propusă de Kärber, utilizează formula următoare :

$$\text{Log. negativ al } LD_{50} = \left(\begin{matrix}\text{log. negativ al celei mai}\\ \text{mici diluții folosite}\end{matrix}\right) - \left[\left(\frac{\begin{matrix}\text{suma mortalităților }\%_0\\ \text{a fiecărei diluții folosite}\end{matrix}}{100} - 0,5\right) \times \left(\begin{matrix}\text{log. rației}\\ \text{diluției}\end{matrix}\right)\right]^{1}$$

sau, în exemplul dat de noi :

$$-2,0 - \left[\left(\frac{100+80+20}{100} - 0,5\right) \times (\text{log. } 10)\right] =$$

$$-2,0 - (2 - 0,5) \times 1 = -2,0 - 1,50 = -3,50.$$

$1\ DL_{50}$ se va găsi deci în diluția $10^{-3,5}$.

Căutînd antilogaritmul valorii obținute, vom stabili diluția suspensiei virulente care conține un DL_{50} respectiv 1/3 200.

Pentru a trece de la diluția care conține $1\ DL_{50}$ la titrul suspensiei virotice, vom aduna la logaritmul cu semn schimbat al acestei diluții logaritmul inversului cantității de virus inoculată.

De exemplu, dacă fiecare șoarece a fost inoculat cu 0,2 ml suspensie virulentă, inversul lui $0,2 \left(\frac{1}{0,2}\right) = 5$, $\log. 5 = 0,7$. Deci $3,5 + 0,7 = 4,2$. Titrul suspensiei titrate este de $10^{4,2}\ DL_{50}/\text{ml}$.

În reacțiile de neutralizare se folosesc în mod obișnuit $100\ DL_{50}$.

Prepararea și titrarea unui ser neutralizant imun. Serurile neutralizante „standard" se obțin fie de la convalescenți, fie de la animalele de laborator imunizate cu inframicrobul respectiv. Pentru titrare, serurile se inactivează timp de 30 de minute la 56°. (Se preferă folosirea serului la cel puțin 24 de ore de la recoltare, în care timp va fi păstrat la gheţar ; înainte de întrebuințare, el va fi inactivat a doua oară.)

Titrarea unui ser se face după tehnica punerii în contact timp de 60 de minute a diluțiilor crescînde de ser cu o diluție constantă de antigen standard, calculată astfel încît $100\ DL_{50}$ să fie conținute în jumătate din cantitatea care se inoculează în fiecare gazdă, urmată de inocularea în organismul sensibil (animal, oul embrionat, cultură celulară).

În practica uzuală se lucrează cu serul diluat 1/2, 1/8, 1/32, 1/128, 1/512 etc., pentru ca prin adaosul unei cantități egale de suspensie virulentă să se obțină diluțiile 1/4, 1/16, 1/64, 1/256 și 1/1 024, respectiv diluțiile exprimate logaritmic de $10^{-0,6}$, $10^{-1,2}$, $10^{-1,8}$, $10^{-2,4}$, $10^{-3,0}$ etc. Diluția serului se face cu soluție fiziologică de NaCl $8,5^0/_{00}$ sau cu tampon veronal sau în cazul în care se lucrează cu culturi celulare, cu soluție salină P. B. S. sau Hanks.

Cîte 0,2 ml[2] din fiecare diluție de ser se pipetează în cîte o eprubetă și apoi se adaugă 0,2 ml din suspensia virulentă. Se agită bine și se lasă pentru o oră la temperatura camerei sau la termostat, la +37°.

După acest timp, din fiecare diluție ser + virus se inoculează cîte 5 – 6 animale sensibile, ouă embrionate etc.

Pentru a îndepărta unii factori generatori de erori, în tot timpul manoperelor de inoculare tuburile cu suspensia ser + virus se vor menține într-un cristalizator cu gheață.

Paralel cu inocularea amestecurilor ser de titrat + suspensie virulentă se vor inocula în condiții similare amestecuri de suspensie virulentă și diluții crescînde de seruri normale (umane sau animale) cunoscute ca lipsite de anticorpi, (*martor ser*).

De asemenea, o serie de animale, ouă embrionate, tuburi de cultură (în funcție de virus) vor fi inoculate cu suspensia virulentă în contact, în condiții identice, cu o cantitate egală de lichid diluant. După inoculare se urmăresc zilnic, atent, animalele, embrionii, culturile de celule, o perioadă egală cu durata de timp necesară pentru producerea bolii, leziunilor

---

[1] În cazul în care se lucrează cu rații de diluție al căror logaritm este egal cu 1, acest factor de corecție nu mai trebuie calculat.

[2] Această cantitate este indicată în cazul întrebuințării șoarecelui ca animal sensibil și a căii intracerebrale. În caz că se folosesc ouă embrionate, culturi de celule sau alte animale de laborator (iepure, cobai), cantitatea de diluție ser va fi mai mare, doza de inoculat necesară fiind mai mare (0,1 ml pentru fiecare ou embrionat, 0,2 ml pentru fiecare tub de cultură, pentru inocularea intracerebrală la un cobai etc.).

caracteristice sau efectului citopatic sub acțiunea diluției de lucru a inframicrobului folosit. Se notează rezultatele pozitive și apoi se calculează (după metoda cumulativă Reed și Muench sau metoda Kärber), titrul serului apreciat prin unități neutralizante 50% (diluția serului care protejează în mod sigur 50% din animalele infectate, ouăle embrionate sau culturile de celule).

Iată, spre exemplu, în tabelul alăturat, rezultatele titrării unui ser antirabic pe șoarece.

Din acest tabel, alcătuit după același principiu ca în cazul calculului *letalității cumulative* se poate vedea că diluțiile critice sînt $10^{-1,2}$ și $10^{-1,8}$.

TABELUL 170

Date cumulative ale titrării unui ser antirabic

Diluția serului	log.	Numărul real al animalelor		Date cumulative		Mortalitate	
		Supraviețuitori	Morți	Supraviețuitori	Morți	Raport	%
1/4	$10^{-0,6}$	5	0	↑ 9	0	0/9	0
1/16	$10^{-1,2}$	3	2	4	2	2/6	33
1/64	$10^{-1,8}$	1	4	1	6	6/7	86
1/256	$10^{-2,4}$	0	5	0	11	11/11	100
1/1 024	$10^{-3,0}$	0	5	0	16 ↓	16/16	100

Pentru a obține DL_{50} al serului, se folosește următoarea formulă de calcul:

$$\frac{50 - \text{mortalitate \% la cea mai mică diluție critică}}{\text{mortalitate \% la cea mai mare diluție critică} - \text{mortalitate \% la cea mai mică diluție critică}} \times \text{log. rației de diluție}$$

sau, în exemplul nostru:

$$\frac{50-33}{86-33} \times 0,6 = \frac{17}{53} \times 0,6 = 0,32 \times 0,6 = 0,19.$$

Acesta se adună (fără a ține seama de semn) la logaritmul negativ al diluției critice mai mici.

În cazul nostru, deci o unitate neutralizantă 50 se va găsi în diluția de ser 1,2 + 0,19, adică $10^{-1,39}$, adică în diluția 1/25.

Titrul neutralizant al serului se exprimă în numărul de unități neutralizante/ml ser nediluat și se calculează ca și în cazul titrului virusului, ținînd seama de cantitatea inoculată.

După formula lui Kärber, mai simplă, calculul se face astfel (folosim rezultatele tabelului 170 însă fără a mai calcula mortalitatea cumulativă):

$$\text{Log. titrului neutralizant 50\%} = \left(\text{log. negativ al celei mai marii diluții de ser}\right) - \left[\left(\frac{\text{suma mortalităților \% la fiecare diluție}}{100} - 0,5\right) \times \left(\text{log. rației de diluție}\right)\right] =$$

$$= -3,0 - \left|\left(\frac{10+80+100+100}{100}\ 0,5\right) \times 0,6\right| =$$

$$= -3,0 - [(2,7) \times (0,6)] = -3,0 - 1,62 = -1,38.$$

Deci, diluția care conține o unitate neutralizantă 50% a serului este de $10^{-1,38}$, corespunzînd diluției de 1/24, valoare practic egală cu cea obținută prin metoda Reed-Muench.

Acest adevăr este valabil numai în cazul în care martorul de ser nu dovedește nici un grad de protecție (cifră de mortalitate egală cu a martorului virus).

În cazul în care serul normal dă o oarecare protecție, titrul serului neutralizant va fi reprezentat de antilogaritmul diferenței dintre logaritmul DL_{50} al serului imun și logaritmul DL_{50} al serului normal.

Un ser neutralizant eficace trebuie să prezinte o diferență de titru față de un ser normal de cel puțin 2 logaritmi.

Tehnica reacției de diagnostic. După cum am mai arătat, reacția de neutralizare poate fi practicată pentru: a) identificarea unui inframicrob cu ajutorul unui ser cunoscut; b) decelarea anticorpilor neutralizanți din serul unui bolnav, față de un inframicrob cunoscut.

a) *Tehnica identificării unui inframicrob prin neutralizare cu un ser imun „standard"*, folosește o diluție din materialul virulent care urmează a fi identificat (diluție producătoare a efectului patogen cunoscut) și seruri imune standard (în funcție de diagnosticul de prezumție), în diluții determinate de titrul stabilit anterior.

Materiale necesare:

— seruri standard, inactivate;

— gazda sensibilă;

— lichid diluant; tuburi de hemoliză; tuburi 16/160, pipete de 1, 5, 10 ml, stelaje etc.

Tehnica reacției. Se realizează diluția materialului de identificat (în funcție de titrul stabilit anterior), astfel încît în jumătate din cantitatea inoculată fiecărei gazde să se găsească 100 DL_{50}; în caz că avem de-a face cu un material netitrat se va lucra cu o diluție care a produs în manoperele de izolare un efect patogen caracteristic sau cu diluția de 1/5.

Într-o serie de eprubete se introduc cîte 0,3 — 0,5 ml din diluția de lucru a produsului de identificat și apoi, cu pipete individuale, cantități egale din diluțiile de ser imun.

Se agită bine tuburile și apoi se lasă o oră la temperatura camerei sau la termostat la 37°, după care se introduc într-un cristalizator cu gheață în care se mențin tot timpul lucrului.

Se inoculează cu fiecare amestec cîte 3 —5 animale, ouă embrionate, tuburi cu culturi celulare (în funcție de inframicrob).

Este necesar să se inoculeze paralel cîte 2—3 animale, ouă, tuburi de culturi etc. cu diluția de virus (fără adaos de ser) (*martori virus*).

Se urmăresc zilnic, cu atenție animalele, ouăle sau culturile celulare și se notează simptomele, decesele, rezultatele necropsice, efectul citopatic etc. Animalele se țin sub observație o perioadă egală cu incubația maximă pentru diluția cea mai întinsă a virusului bănuit (în cazul inoculării la animal) sau numai cîteva zile (4 — 8) în cazul inoculării în ouă embrionate sau culturi celulare.

Identificarea inframicrobului se face pe baza diferenței dintre protecția dată de unul din serurile imune față de celelalte seruri folosite.

b) *Tehnica diagnosticului unui ser prin neutralizarea unui virus cunoscut.* În cazul identificării unui ser prin proba neutralizării se folosesc diluții crescînde ale serului de diagnosticat și o diluție constantă (100 DL_{50}) a virusului cunoscut.

Materiale necesare:

— tulpină de virus tip, prealabil titrată;

— serul de diagnosticat (probe duble, recoltate la interval de 7 — 20 de zile);

— lichid diluant, eprubete, pipete, stelaje etc.

Tehnica reacției. În linii mari, tehnica reacției este asemănătoare cu cea descrisă în cazul identificării unui produs necunoscut.

Spre deosebire de această tehnică, se folosește o diluție constantă de antigen (100 DL_{50}) și diluții crescînde ale serului de diagnosticat (1/2, 1/8, 1/32, 1/128 ș.a.m.d.) (vezi tabelul 171).

Rezultatul seroneutralizării se apreciază prin comparație cu reacția martoră efectuată cu serul normal și mai ales prin creșterea titrului anticorpilor în proba a doua de ser, față de prima probă, de cel puțin 4 ori.

TABELUL 171

Schema reacției de neutralizare pentru diagnosticul unui ser necunoscut

Tubul nr.	1	2	3	4	Martori	
					5	6
Antigen (100 DL_{50}) ml[1]	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Serul de diagnosticat, inactivat, diluție	1/2	1/8	1/32	1/128	—	—
ml	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—
Lichid diluant, ml	—	—	—	—	0,2	—
Ser normal, fără anticorpi	—	—	—	—	—	0,2

[1] Cantitate în funcție de organismul sensibil inoculat.

În cazurile în care nu putem executa o reacție completă de tipul celei descrise (de obicei din cauza unei prea mici cantități de ser), putem face o reacție de neutralizare, de orientare, în 3 tuburi.

În *tubul 1* se pune în contact antigenul (100 DL_{50}) cu o cantitate egală din proba I a serului de diagnosticat (diluat 1/2), *în tubul 2*, antigenul (100 DL_{50}) cu o cantitate egală din diluția 1/2 a probei a II-a din serul de diagnosticat, iar în *tubul 3*, antigenul (100 DL_{50}) cu o cantitate egală din serul normal (diluat 1/2).

Tehnica neutralizării și inoculării este asemănătoare cu cea descrisă mai sus.

Pentru stabilirea diagnosticului, este necesar ca, în opoziție cu serul martor, serul suspect (ambele probe sau numai proba a II-a) să protejeze gazdele sensibile.

REACȚIA DE AGLUTINARE A CORPUSCULILOR ELEMENTARI

Reacția de aglutinare a corpusculilor elementari are astăzi o aplicație largă, în special în diagnosticul unor pararickettsioze și rickettsioze umane.

Reacția se bazează pe aglutinarea corpusculilor inframicrobieni sub acțiunea serului imun după un contact prelungit la temperatura laboratorului, la 37° sau chiar la 50°, în funcție de inframicrobul studiat.

S-au descris mai multe tehnici și microtehnici în tuburi sau pe lamă.

Produse necesare:

— antigen conținînd corpusculi inframicrobieni purificați;

— ser de diagnosticat;

— ser imun, standard.

Antigenul se obține după mai multe metode. Dintre acestea recomandăm tehnicile Zdrodowski și Castaneda.

Tehnica Zdrodowski. Se recoltează steril membranele viteline ale embrionilor inoculați anterior, se cîntăresc și apoi se triturează în flacoane cu perle de sticlă.

După triturare, se adaugă pentru fiecare gram de membrană 10 ml soluție clorurosodică 9$^0/_{00}$ cu 0,4% formol și 5% tampon fosfat, pH = 7,4[1], amestecul introducîndu-se la ghețar.

După 48 de ore se centrifughează 10 minute la 1 500 turații /min. Se recoltează supernatantul care se centrifughează 60 de minute la 5 000 turații/min.

Depozitul obținut se suspendă în jumătate din volumul inițial de soluție cloruro-sodică cu formol și soluție tampon. Se agită și se adaugă o cantitate egală de eter. Se agită puternic și apoi se lasă în repaus 10 minute. Se recoltează faza apoasă și se tratează din nou cu eter. După 5 astfel de manopere, faza apoasă se supune unui vid slab pentru eliminarea eterului și apoi se centrifughează 1 — 2 ore la 5 000 turații/min.

Depozitul reluat într-un sfert de volum de ser fiziologic cu 0,20% formol și 5% soluție tampon constituie antigenul.

Tehnica Castaneda, modificată de Sulman. Această tehnică este folosită în special pentru rickettsii.

Plămînii șoarecilor sau membranele viteline ale embrionilor, infectați experimental, se triturează cu nisip de cuarț într-un mojar, prin adăugare treptată de soluție fiziologică NaCl 8,5$^0/_{00}$, în cantitate de 1 ml pentru un plămîn sau o membrană vitelină.

Trituratul se centrifughează 10 minute la 1 500 turații/min.

Supernatantul se depune deoparte, iar sedimentul se reia în soluție fiziologică cloruro-sodică, jumătate din volumul inițial, și se centrifughează 10 minute la 1 500 turații/min.

Supernatantul din prima și a doua centrifugare se adună și apoi se centrifughează o oră la 5 000 turații/min.

Sedimentul, constituit în special din corpusculii rickettsieni, se spală prin centrifugări repetate, de 3 ori, cu soluție fiziologică NaCl 8,5$^0/_{00}$.

După ultima centrifugare, depozitul este reluat în soluție fiziologică cloruro-sodică care conține 0,5% fenol și 5% amestec tampon fosfat, pH 7,4.

Suspensia obținută se lasă 24 de ore la temperatura camerei, după care se aspiră cu atenție lichidul din eprubetă și se centrifughează 1 oră la 5 000 turații/min. Sedimentul este reluat în soluție fiziologică cloruro-sodică cu 0,25% fenol sau 0,20% formol și 5% tampon fosfat, pH = 7,4. Concentrația antigenului se stabilește după standardul bacteriologic la 500 000 000—1 000 000 000 corpusculi rickettsieni pe mililitru.

Tehnica Giroud (pentru reacția de microaglutinare pe lamă). Plămîni de șoarece sau membrane viteline, recoltate în momentul de maximă dezvoltare a germenilor, sînt triturați și suspendați în ser fiziologic, tamponat și formolat 2$^0/_{00}$ (20 ml diluant pentru 300 mg plămîn de șoarece sau pentru o membrană vitelină). În cazul utilizării sacilor vitelini, lipidele sînt eliminate cu ajutorul eterului.

Se decantează lichidul supernatant în tuburi de 16 × 160 și se lasă 8 zile la ghețar (+4°).

Lichidul supernatant constituie antigenul.

Antigenele preparate după tehnicile descrise se pot conserva la rece timp variabil (4—6 luni).

Serul imun, standard, se obține de la convalescenți sau de la animale de laborator imunizate.

Serul normal se obține de la oameni sănătoși sau de la animale normale din aceeași specie cu cea pe care s-a preparat serul standard.

Serul de diagnosticat va fi recoltat în condiții obișnuite de sterilitate, în perioada de stare și în special în convalescența bolii. Pentru tehnica de microaglutinare, serul trebuie să fie proaspăt (aglutinabilitatea scade pe măsură ce serul este păstrat la ghețar).

Tehnica reacției. Reacția de aglutinare a corpusculilor inframicrobieni se poate executa după mai multe tehnici, în tuburi sau pe lamă.

Redăm pe scurt cîteva din tehnicile propuse:

Tehnica uzuală în tuburi. În 8 tuburi de hemoliză se introduc cîte 0,25 ml din diluții crescînde de ser (1/10...1/1 280) și 0,25 ml din antigenul corpuscular.

În caz că reacția se folosește pentru *identificarea unui germen necunoscut*, în afara seriei cu ser imun standard, se prepară 2 tuburi cu ser normal. În caz că reacția se folosește *pentru diagnosticul serologic*, prin evidențierea anticorpilor aglutinanți în sîngele bolnavului (cel mai frecvent), în afară de seria de tuburi cu serul de diagnosticat, se prepară şi cîte 2 tuburi martor (cu ser standard şi ser sigur negativ).

---

[1] La 1 litru de apă bidistilată se adaugă 0,91 g KH_2PO_4 și 10,69 g Na_2HPO_4.

Separat se prepară alte 2 eprubete martor: una cu 0,25 ml ser de diagnosticat şi 0,25 ml lichid diluant şi o a doua cu 0,25 ml antigen şi 0,25 ml lichid diluant.

Tuburile se agită puternic şi apoi se introduc pentru 12—18 ore la 37°.

După acest timp, avînd grijă să nu se agite eprubetele, se citeşte rezultatul reacţiei de aglutinare cu ochiul liber sau de preferinţă cu o lupă. Rezultatele pozitive, apreciate prin comparaţie cu tuburile martor, se notează după următoarele criterii:

++++ = depozit bogat, neregulat, pe fundul eprubetei cu lichid supernatant perfect clar;
+++ = depozit neregulat pe fundul eprubetei, lichid clar, cu granulţii de dimensiuni variate vizibile cu ochiul liber;
++ = depozit granular foarte redus, lichid slab opalescent cu granulaţii fine;
+ = lipsa depozitului, lichid slab opalescent cu granulaţii fine, vizibile numai cu lupa;
0 = lipsa oricărei granulaţii, aspect asemănător cu martorul.

Tehnica Psenicinov-Raiher. Din diluţii crescînde de ser se pune cîte o picătură pe lame de sticlă perfect curate. Se adaugă la fiecare picătură de ser o picătură de antigen şi se amestecă rapid prin rotaţia uşoară a lamei. Lamele se introduc la termostat la 37° într-o cameră umedă, unde se menţin o oră.

După acest timp, fiecare picătură este întinsă şi frotiul obţinut se colorează cu metoda Romanowski-Giemsa. Preparatul colorat se examinează cu un obiectiv cu imersie.

Rezultate. În cazul unei reacţii pozitive se decelează o aglutinare netă. În caz negativ, antigenul va fi răspîndit în mod egal în preparat.

Tehnica Giroud. Din serul de cercetat se fac diluţiile 1/5, 1/10, 1/20, 1/40. Din fiecare diluţie se iau, cu o pipetă Pasteur, 1—2 picături, care se introduc în godeul unei plăci Kline. Peste picăturile din diluţiile de ser se adaugă un număr egal de picături din antigenul specific. După o uşoară agitare a lamelor, se ia cu pipete Pasteur individuale cîte o picătură din fiecare amestec şi se pun pe o lamă de sticlă perfect degresată, avînd grijă ca picăturile să nu aibă un diametru mai mare de 5 mm.

La fiecare serie de reacţii va trebui să existe şi lame martor: antigen + ser fiziologic.

Lamele sînt aşezate pe un suport de sticlă în cutii Petri, la fundul cărora se găsesc 2—3 ml ser sanguin.

Se lasă 24 de ore la temperatura camerei, după care lamele sînt scoase, uscate la 37° şi colorate timp de 1—2 minute cu amestec May-Grünwald.

Se adaugă apă neutră în cantitate egală, de asemenea, 1—2 minute, se îndepărtează colorantul şi se reacoperă cu soluţia Giemsa (2 picături/ml apă distilată neutră).

Colorantul se lasă 30—60 de minute, după care este îndepărtat. Spălare cu apă de robinet. Uscare.

Dacă se constată o precipitare a colorantului, lama va fi spălată cu un amestec de alcool-xilol (āā), avînd grijă să oprim decolorarea cu xilol. Dacă coloraţia nu dă satisfacţie, lama poate fi recolorată cu amestecul Giemsa.

Rezultatele acestei microreacţii de aglutinare se apreciază la microscop cu ajutorul obiectivului de imersie.

În caz de reacţie pozitivă, corpusculii inframicrobieni apar aglutinaţi în grămezi de dimensiuni variate (10—50 de corpusculi).

Observarea unei aglutinări la periferie acordă reacţiei un caracter dubios şi necesită o repetare la un interval de cîteva zile.

În caz de reacţie negativă, corpusculii sînt dispersaţi pe tot cîmpul microscopic întocmai ca şi în picătura martor.

SEROREACŢIA WEIL-FELIX

Descoperită în 1916 de către E. Weil şi A. Felix, seroreacţia, denumită după autorii ei *seroreacţia Weil-Felix*, este bazată pe aglutinarea unor tulpini ale bacilului *Proteus*, în special a tulpinii X_{19}, de către serul bolnavilor de tifos exantematic.

Reacţia, căreia i s-au adus numeroase modificări, este astăzi mult utilizată pentru diagnosticul de laborator al diferitelor afecţiuni din grupul febrelor exantematice; în acelaşi timp, seroreacţia poate fi folosită ca o reacţie complementară şi în diagnosticul altor inframicrobioze umane (pneumonie atipică, trahom, limfogranulomatoză benignă).

Materialul necesar pentru ser :

- antigen *Proteus* OX_{19} alcoolat ;
- 10 eprubete de hemoliză ;
- 3 eprubete de 150 × 10 ;
- 2 pipete de 1 ml divizate în sutimi ;
- 1 pipetă de 5 ml ;
- soluție fiziologică de NaCl 8,5 ‰ ;
- aglutinoscop etc.

Ca *antigen* se întrebuințează o suspensie de bacili *Proteus* în soluție fiziologică de NaCl 8,5$^0/_{00}$. Se recomandă folosirea unei tulpini verificate în cultură de 18—24 de ore pe geloză înclinată ; cel mai des se lucrează cu *Proteus* X_{19}. Dat fiind însă că s-a putut dovedi că diferitelor varietăți de febră exantematică le corespunde o anumită tulpină de *Proteus*, alegerea antigenului trebuie făcută cu multă atenție.

Iată, după Frobisher, aglutinabilitatea diferitelor tulpini de *Proteus* în principalele grupe de febre exantematice :

Varietatea de *Proteus*	Grupul tifosului	Grupul Tsutsugamusi	Grupul febrelor pătate
OX_{19}	+ + +	0	+ +
OX_2	+	0	+ +
OX_k	0	+ + +	0

Cele mai bune rezultate se obțin prin întrebuințarea antigenului somatic „O'' (glucido-lipido-polipeptidic) al *Proteus*-ului X_{19}, care, după cum au arătat M. Ciucă și L. Mesrobeanu, este singur responsabil de producerea aglutinării în prezența serului specific. Din această cauză, în reacție se vor folosi exclusiv colonii pure „O'' de tip „Smooth'', pe care le vom feri de degradarea „Rough'' ce se face în detrimentul caracterului antigenic „O''.

În afara suspensiei de germeni vii, se poate folosi o suspensie stabilă alcoolată [1], care are avantajul de a da rezultate constante, comparabile de la un laborator la altul.

Antigenul standard se prepară astfel :

O cultură de 24 de ore, de *Proteus* OX_{19} de tip S este emulsionată în 10 ml ser fiziologic, după care se adaugă 30 ml alcool 96°. Amestecul astfel obținut se menține 24 de ore la întuneric, la temperatura camerei.

După acest timp, suspensia se spală prin centrifugare, de 4 ori, cu ser fiziologic de NaCl 9 ‰.

Sedimentul obținut după a 4-a centrifugare este reluat în serul fiziologic tamponat, pH = 7,4, într-o diluție care să cuprindă 10 miliarde de germeni pe mililitru.

Din antigenul standard se face în momentul reacției o diluție de 1/20 în soluție fiziologică NaCl 8,5$^0/_{00}$, cu care se execută reacția.

Serul sanguin de cercetat, recoltat cu o seringă uscată, va fi diluat 1/10 în soluție fiziologică de NaCl 8,5 ‰ și folosit în diluții succesive.

Tehnica reacției. După realizarea diluțiilor de ser se adaugă în fiecare tub cîte 0,6 ml din diluția de antigen standard 1/20 (500 milioane de germeni/ml), se agită tuburile și se introduc în termostatul de 37° (tabelul 172).

O primă citire cu aglutinoscopul se face după 2 ore de menținere la termostat, iar o a doua citire, după 16—20 de ore la temperatura laboratorului.

Se consideră pozitive tuburile în care apare o aglutinare mai mult sau mai puțin intensă. Gradul de aglutinabilitate apreciat cu ochiul liber sau cu aglutinoscopul se notează cu una, două, trei sau patru cruci, după următoarele criterii :

± = aglutinare foarte slabă, vizibilă numai cu aglutinoscopul ;
+ = aglutinare foarte slabă, abia vizibilă cu ochiul liber ;
+ + = aglutinare netă, vizibilă cu ochiul liber ; lichid ușor opalescent ;
+ + + = aglutinare netă, vizibilă cu ochiul liber, cu depozit la fundul eprubetei și cu un lichid aproape clar ;
+ + + + = aglutinare netă, perfect vizibilă cu ochiul liber, cu depozit la fundul eprubetei și cu lichid total clarificat.

Pentru ca reacția să fie considerată valabilă, *tubul martor* nu trebuie să conțină nici o urmă de aglutinare, iar lichidul trebuie să fie omogen opalescent. Același aspect se întîlnește și în tuburile negative.

Aglutinarea de tip granular apare evidentă, cel mai des, la prima citire, titrul crescînd cu 1—2 tuburi la citirea a 2-a.

Se consideră pozitive cu valoare diagnostică *numai* aglutinările care depășesc titrul de 1/200.

Diferite variante ale reacției Weil-Felix

I. A. Minkevici, V. I. Rabinovici și R. D. Zaslovskaia, au descris în 1935 o metodă rapidă de aglutinare a proteusului pe lamă.

---

[1] Institutul „Dr. I. Cantacuzino'' prepară un antigen standard alcoolat, conținînd 10 miliarde de germeni pe mililitru.

TABELUL 172

Schema diluțiilor în reacția Weil-Felix[1]

	Ser bolnav diluat									Martor
	1/10			1/100			1/1 000			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Soluție fiziologică NaCl 8,5‰, ml	—	0,2	0,3	—	0,2	0,3	—	0,2	0,3	0,4
Diluție ser bolnav, ml	0,4	0,2	0,1	0,4	0,2	0,1	0,4	0,2	0,1	—
Suspensie alcoolată Proteus OX_{19} (diluată pentru a conține 500 milioane germeni/ml), ml	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Diluție finală ser	1/25	1/50	1/100	1/250	1/500	1/1 000	1/2 500	1/5 000	1/10 000	

2 ore la 37°; 16–20 de ore la temperatura laboratorului

[1] Diluțiile sînt calculate astfel ca în fiecare tub concentrația germenilor să fie de aproximativ 450–600 milioane/ml.

În 1942, W. Steuer a aplicat pe o scară largă această metodă care a primit nejust denumirea de reacția Kudicke-Steuer.

Iată tehnica reacției Minkevici-Kudicke-Steuer:

Material necesar pentru un ser:

— antigen alcoolat de Proteus OX_{19} (10 miliarde germeni/ml);

— lamă de sticlă perfect degresată;

— ac Francke sau un ac de seringă;

— ansă de platină;

— vată, alcool, eter.

Se înțeapă cu un ac pulpa degetului bolnavului și se depune pe o lamă perfect degresată 3 picături de sînge, cît mai egale. Aceasta se obține comod prin folosirea unei anse de platină cu diametrul interior de 2 mm și cu grosimea firului de 0,6 mm.

După ce picăturile de sînge au fost depuse pe lamă, cu ansa sau cu ajutorul vîrfului unei lame curate, se amestecă circular, uniform, realizîndu-se o picătură groasă, mare cu un diametru de 1–1,5 cm, ce se lasă să se usuce la temperatura camerii.

Se adaugă apoi la suprafața picăturilor uscate antigenul, nediluat (o picătură — 0,2 ml — din suspensia alcoolată de Proteus OX_{19}), de 20 de ori mai concentrat ca cel folosit în reacția Weil-Felix (10 miliarde germeni/ml).

Amestecul antigenului cu sîngele uscat *se face numai prin mișcări de înclinare a lamei*, niciodată prin folosirea unei baghete de sticlă care ar putea să rupă fragmente din pelicula de sînge și să ducă astfel la erori în interpretarea rezultatelor.

În cazurile pozitive, apare rapid (1–20 de minute) o aglutinare vizibilă cu ochiul liber. Aglutinarea pe lamă corespunde unui titru aglutinant al serului de cel puțin 1/250. În caz de reacție negativă, amestecul antigen-sînge, rămîne opalescent omogen.

Deși reacția pe lamă, extrem de simplă, este de o sensibilitate egală celei a aglutinării clasice, ea trebuie să constituie ***numai o reacție de orientare***, care trebuie completată cu o reacție în tuburi.

TEHNICA ANTICORPILOR FLUORESCENȚI

Folosită inițial exclusiv în cercetări variate de microbiologie și inframicrobiologie, tehnica anticorpilor fluorescenți a intrat în ultimii ani și în laboratoarele de diagnostic, cucerind repede noi domenii de aplicare.

Imaginată de Coons (1942), tehnica reușește să identifice și să situeze chiar cantități foarte mici de antigen în diferite produse și preparate (frotiuri, secțiuni), prin vizualizarea cuplării anticorpilor la suprafața antigenului specific, bineînțeles prin folosirea unor substanțe fluorescente care se dovedesc capabile a emite lumină în spectrul vizibil atunci cînd sînt iradiate cu ultraviolete. Metoda mai are avantajul de a decela chiar anticorpi incompleți și, în anumite tehnici, să dovedească existența unei reacții de fixare a complementului pozitivă, chiar cînd aceasta apare negativă cu metoda clasică.

Metoda cunoaște mai multe procedee dintre care de cel mai mare interes pentru diagnostic sînt *metoda directă* și *metoda indirectă*.

În metoda directă serul imun cuplat cu substanța fluorescentă este aplicat peste antigenul specific, dînd naștere unui complex fluorescent. Această metodă cunoaște și o tehnică denumită *directă*, negativă: antigenul este pus în contact cu serul de cercetat și apoi cu serul imun cuplat cu o substanță fluorescentă. Reacția negativă precizează prezența anticorpilor specifici în serul de cercetat.

Metoda indirectă, cu 2 timpi: 1) punerea în contact a antigenului cu un ser imun necuplat; 2) adăugarea peste complexul format a unui ser fluorescent antiglobulinic, preparat față de specia de la care provine serul imun. În această metodă, serul antiglobulinic se fixează pe globulina anticorp, indicînd astfel în mod indirect prezența antigenului.

În afara metodelor ,,directe'' și ,,indirecte'' s-a descris și o reacție de ,,fixare de complement'' în fluorescență.

Antigenul cunoscut este tratat cu diluții crescînde din serul de diagnosticat la care se adaugă alexină de cobai (diluție 1/10). Preparatul este ulterior tratat cu ser anti-cobai (preparat pe iepure) cuplat cu o substanță fluorescentă. În caz de reacție pozitivă, se poate preciza existența, în serul de diagnosticat, a anticorpilor specifici fixatori de complement.

Pentru realizarea oricăreia din metodele imaginate sînt necesare:

— un izvor de lumină bogat în R.U.V.;

— un microscop adaptat pentru examenul în fluorescență;

— substanțe fluorescente (flourocromii);

— lame de sticlă nefluorescentă.

Izvorul de lumină poate fi reprezentat de o lampă cu arc voltaic și electrozi de cărbune sau de preferință de o lampă electrică cu vapori de mercur la presiune mare (tip Ossram HBO 200 sau HBO 50).

Fasciculul luminos emis de lampă va trebui trecut inițial printr-un filtru care reține razele roșii și infraroșii (cuvă de cuarț plină cu o soluție de SO_4Cu chimic pur 2% în apă distilată sau filtru de sticlă BG 12). După trecerea prin acest filtru, fasciculul luminos va trebui făcut să treacă printr-un filtru Wood UG 1 care oprește razele din spectrul vizibil.

Microscopul pentru examenul în fluorescență este de tip obișnuit, cu lentile acromatice sau apocromatice. Se va prefera un microscop monocular. Peste ocular se va monta un filtru de sticlă galbenă (care oprește razele U.V.), de preferință un filtru GG 9.

Substanțele fluorescente. Dintre numeroasele substanțe fluorescente cunoscute, mai frecvent se utilizează *fluoresceina* (izocianat sau izothiocianat) și Rhodamine Lissamina B-200 (R.B. 200).

Pentru calitățile sale și în special pentru stabilitatea mai mare, se recomandă izothiocianatul de fluoresceină.

Deoarece substanțele fluorescente sînt repede degradate în contact cu apa, ele trebuie păstrate în perfectă stare de desicație. Izothiocianatul se păstrează la întuneric și la rece, uscat în vid, fie pe hîrtie de filtru [1], fie pe pulbere de diatomee [2] (Celită 545 de 30—80 mesh).

Lamele de sticlă pentru fluorescență sînt lame subțiri (0,9—1 mm) preparate dintr-o sticlă specială permeabilă la R.U.V.

Tehnica de lucru. Înainte de a descrie tehnica de lucru propriu-zisă, vom expune *tehnicile de preparare a anticorpilor fluorescenți* și a *preparatelor microscopice.*

Prepararea anticorpilor fluorescenți. Pentru obținerea de rezultate bune se recomandă folosirea unor seruri purificate sau concentrate, dar mai ales a fracțiunilor γ-globulinice separate cu ajutorul sulfatului de amoniu semisaturat.

Deoarece în mod obișnuit este necesară dozarea conținutului în proteine, pentru simplificarea timpului de lucru, s-au recomandat unele tehnici care evită acest timp (Goldman, Balș etc.).

Iată, după M. Balș, o astfel de tehnică:

Într-un pahar Erlenmeyer se introduc în ordine:

— ser imun, nativ 1,5 ml;
— sol. NaCl 0,15 M 1,5 ml;
— sol. tampon (carbonat-bicarbonat de Na 0,5 M), pH = 9 1,5 ml.

Toate aceste ingrediente trebuie să fie folosite la 4°. După agitare se adaugă treptat, lent (5—10 minute), agitînd mereu, 5 mg izocianat de fluoresceină, conținut în 5—7 ml hîrtie de filtru tăiată mărunt sau 0,10—0,25 g pulbere de diatomee.

Se agită bine (de preferat cu un agitator magnetic) la +4°, timp de 24 de ore, dacă s-a folosit ca suport hîrtia de filtru, sau 1—2 ore, cînd s-a folosit pulberea de diatomee, după care se lasă în contact 12—24 de ore la ghețar.

Lichidul obținut, puternic fluorescent, se amestecă cu 0,15 g pulbere de cărbune activ. Se lasă în contact 10—15 minute și apoi se centrifughează 15 minute la 3 000 ture/min. Supernatantul se recoltează și se pune la dializă la rece, într-un sac de celofan contra unei soluții saline cu pH = 7 (NaCl 0,15 M și tampon-fosfați cu pH = 7, 0.06 M).

---

[1] 1 mg substanță pe 1 — 1,2 cm² hîrtie.

[2] 5 mg substanță pe 0,10 — 0,25 g pulbere.

Lichidul fluorescent se schimbă din 8 în 8 ore, pînă cînd nu mai prezintă nici o urmă de fluorescență (24 de ore — 4 zile).

Serul fluorescent din sac se trece într-o eprubetă îngustă, după care se adaugă mertiolat de Na 1/10 000.

Înainte de a fi folosit în investigațiile virusologice, se recomandă adsorbția pe pulbere de ficat uscat în acetonă.

Pentru aceasta se amestecă 1 ml din soluția anticorpi fluorescenți, cu 0,1 g din pulberea de ficat[1]. Se agită bine 30—60 minute și apoi se centrifughează la turația de 3 000 ture/min. Supernatantul se mertiolează 1/10 000.

Serurile fluorescente native sau după adsorbție se pot menține timp îndelungat la ghețar (cîteva luni) sau chiar cîțiva ani, după liofilizare. În acest din urmă caz, ele se vor păstra de asemenea la ghețar și la întuneric.

Prepararea frotiurilor și secțiunilor. Frotiurile din produsele patologic virotice, realizate pe lame perfect curate, sînt fixate 10 minute cu acetonă pură. După fixare, lamele sînt uscate 20 de minute la 37° și apoi tratate de urgență cu anticorpii fluorescenți. Dacă aceasta nu se poate realiza, ele vor fi conservate la congelator.

Secțiunile obținute la microtomul de gheață vor fi uscate rapid în vid și la temperatură joasă (de la —40 pînă la —70°).

Tehnica de lucru propriu-zisă. În *metoda directă* preparatele (frotiuri sau secțiuni) se acoperă cu o picătură de anticorpi fluorescenți și se introduc la 37° într-o cameră umedă pentru 10—30 de minute. Se îndepărtează serul fluorescent cu ser fiziologic tamponat la pH = 7, apoi preparatul se spală cu atenție cu aceeași soluție salină de 3—5 ori.

Spălările se realizează prin menținerea preparatului acoperit cu o soluție salină timp de 5 minute în cameră umedă.

În metoda indirectă fragmentele se acoperă cu serul imun nativ, nefluorescent, se spală cu soluție salină și se acoperă cu serul antiglobulinic fluorescent[2] (de tipul speciei producătoare de ser imun) și se spală din nou.

După ultima spălare, atît în metoda directă, cît și în cea indirectă, preparatul uscat rapid la aer este montat în glicerină tamponată (9 volume glicerină + 1 volum soluție tampon-fosfat, pH = 7,4). După aplicarea lamelei, se parafinează marginile. Lamele astfel pregătite pot fi examinate și păstrate cîteva zile la ghețar.

Examinarea preparatelor. După concentrarea fasciculului luminos, se coboară condensatorul (de preferință cu cîmp întunecat de ultramicroscop), pe care se aplică apoi o picătură de glicerină pură. O picătură de glicerină se va pune și pe fața inferioară a lamei de examinat. Se ridică condensatorul pînă ce se unesc picăturile de glicerină.

Cu ajutorul unui obiectiv mic se recontrolează centrarea fasciculului luminos[3]. După punerea la punct se examinează cu celelalte obiective, inclusiv obiectivul de imersie (în loc de ulei de imersie obișnuit, se folosește glicerină pură tamponată cu pH = 7,2—7,4).

Examinarea nu trebuie să depășească 10—30 de minute, deoarece un timp mai îndelungat duce la epuizarea fluorescenței.

De reținut că examinarea produselor trebuie făcută într-o cameră întunecoasă.

Rezultate. Fixarea anticorpilor fluorescenți pe antigen apare evidentă prin constatarea la nivelul celulelor a unei luminiscențe galbene-verzui. Va trebui făcută cu mare atenție, pentru a nu confunda fluorescența specifică a anticorpilor cu aceea naturală, nespecifică, a celulelor care apare albă-albăstruie. O interpretare corectă nu va putea fi făcută decît prin compararea cu preparatele examinate după colorare cu anticorpi nespecifici față de antigenul care trebuie decelat.

---

[1] 10—50 g ficat proaspăt de cocoș sau de om, omogenizat în volum egal de soluție NaCl 0,15 M, se amestecă cu 4 volume de acetonă, se agită. Se decantează supernatantul, iar sedimentul se spală prin centrifugări repetate cu soluție salină, pînă ce lichidul devine incolor. Sedimentul se resuspendă într-un volum egal de soluție salină, se adaugă 4 volume acetonă, se agită, se elimină supernatantul, iar sedimentului i se readaugă 4 volume acetonă.

Se filtrează prin filtru Buchner. Reziduul se spală cu puțină acetonă și se usucă 12 ore la 37°.

Materialul uscat se păstrează în flacoane închise la ghețar.

[2] Serul antiglobulinic se obține cel mai bine pe iepure, după schema următoare : soluție γ-globulină umană, diluată cu soluție tampon-fosfat cu pH = 7,2, la concentrația de 1,6—2% globulină, este amestecată încet cu 10 ml soluție 2% alaun de K, menținîndu-se pH-ul în jurul lui 7,2. Pentru conservare, se adaugă antibiotice și se păstrează la +4°. Înainte de utilizare, se agită puternic.

Animalele primesc la 3—4 zile cîte o injecție intravenoasă, începînd cu 0,3 ml și terminînd cu 1 ml (total 10 injecții).

După 15 zile repaus se fac 3 injecții de rapel de cîte 1 ml. După alte 30 de zile de repaus se face o nouă inoculare de rapel, urmată la 8 zile de o sîngerare de probă. Serul trebuie să aibă un titru minim de 1/40 000. În caz că acest titru nu a fost atins, după o pauză de o lună se face un nou rapel (Niel și Fribourg).

[3] Dacă în cîmpul microscopic rămîne o zonă mică circulară întunecată, înseamnă că lama este prea groasă sau că preparatul este plasat invers.

★

Introducerea tehnicilor anticorpilor fluorescenți în practica uzuală a laboratoarelor de diagnostic virusologic cîștigă zi de zi noi domenii de aplicare. Turbarea, gripa, variola, oreionul, encefalita şi multe alte inframicrobioze beneficiază la ora actuală de această nouă cucerire a tehnicii, cu perspective din ce în ce mai mari. La capitolele din partea specială, dedicate diferitelor inframicrobioze sînt redate amănunte şi limitele metodei în cazurile respective.

BIBLIOGRAFIE

ADERCA I. şi IANCONESCU M. — Culturi de celule în inframicrobiologie, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1962.

BADENSKI S. şi BRUCKNER I. — *Arch. Roum. Pathol. exp.*, 1937, vol. 10, p. 341.

BALŞ M. — *Microbiologia, (Bucureşti)*, 1961, nr. 5, p. 455.

BEVERIDGE W. I. — *Spec. Rep. Ser. med. Res. Coun. (Lond.)*.1946, nr. 256.

BONCIU C., DEMETRESCU R. şi PETROVICI M. — *Arch. Roum. Pathol. exp.*, 1960, vol. 19, p. 111.

BORODINA T. A. — *Vop. Virusol.*, 1956, nr. 5, p. 51.

BURNET F. M. — Principles of animal virology, Academic Press Inc., N.Y., 1955.

CAJAL N. şi MATEESCU S. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1955, vol. 6, p. 35.

CAJAL N. — Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1958.

COONS A. H. — *J. exp. Med.*, 1950, vol. 91, p. 1.

CORNELSON D., CONSTANTINESCU M. N., DRAGOMIR C. — *Bul. sci. roum. Sect. Sci. med.*, 1949, t. 1, p. 659.

CASALS J., PALACIOS R. — *J. esp. Med.*, 1941, vol. 74, p. 409.

DUMAS J. — Les animaux de laboratoire, Ed. Flammarion, Paris, 1954.

ENDERS J. F., WELLER T. H., ROBBINS F. C. — *Science*, 1949, vol. 109, p. 85.

ENDERS J. F., PEEBLES T. C. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1954, vol. 86, p. 277.

FLORSDORF E. W., MUDD S. — *J. Immunol.*, 1935, vol. 29, p. 389.

GRUIA M. — Parotidita epidemică, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, Bucureşti, 1962, p. 583.

HIRST G. K. — *Science*, 1941, vol. 94, p. 22.

HORODNICEANU FL. şi KLEIN R. — *Microbiologia (Bucureşti)*, 1958, nr. 5, p. 457.

HĂNGĂNUȚIU M. — *C.R. Soc. Biol.*, 1924, vol. 91, p. 1 457.

JAWETZ E., MELNICK J., ADELBERG E. — Review of medical microbiology, 3rd Ed., Ed. Lange, Canada, 1958.

JDANOV V. M. — Epidemiologhia, Medghiz, Moscova, 1961.

LÉPINE P., SOHIER R. — Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus, Ed. Masson, Paris, 1954.

LEVADITI C. — *C.R. Soc. Biol.*, 1913, vol. 74, p. 1 179; vol. 75, p. 2 202.

LEVADITI C. şi LÉPINE P. — Les ultravirus des maladies humaines, 2e ed., Ed. Maloine, Paris, 1948.

LIM K. A., BENYESH-MELNICK M. — *J. Immunol.*, 1960, vol. 84, p. 309.

LVOVA A. I. — *Acta Virol.*, 1962, vol. 6, p. 283.

MARINESCU G. — Limfocitoza şi mononucleoza infecțioasă, Ed. medicală, Bucureşti, 1960.

MARSHALL I. M. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1958, vol. 18, p. 838.

MATEESCU S. şi CAJAL N. — *Microbiologia (Bucureşti)*, 1956, nr. 2, p. 88.

NICOLAU S. şi KOPCIOWSKA L. — *C.R. Soc. Biol.*, 1937, vol. 126, p. 211.

NICOLAU S. — *C.R. Soc. Biol.*, 1937, vol. 126, p. 326.

NICOLAU S. — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, vol. 130, p. 993.

NICOLAU S. — Elemente de inframicrobiologie generală, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1956.

NICOLAU S., CONSTANTINESCU N., CAJAL N. — Turbarea, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1962.

NIEL G. şi FRIBOURG-BLANC A. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1962, vol. 102, p. 616.

PAUL J. R., W. W. BUNNELL — *Amer. J. med. Sci.*, 1932, vol. 183, p. 90.

SĂRĂȚEANU D. — Ornitoza, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1963.

SCHMIDT N., LENNETTE E. — *Progr. med. virol.*, 1961, vol. 3, p. 1.

SCHMIDT N. Y., GUENTHER R. W., LENNETTE E. — *J. Immunol.*, 1961, vol. 87, p. 623.

SMORODINTSEV A. A. — Gripp, Izd. Akad. Med. Nauk, S.S.S.R., Moscova, 1963, p. 138.

SUBLADZE A. K. şi GAIDAMOVICI S. I. — Kratkii kurs prakticeskoi virusologhii, Medghiz, Moscova, 1954.

TAYLOR R. M., CHIALVO R. — *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1942, vol. 51, p. 328.

TAGA M., GEORGESCU V., TAGA L. şi CIRSTEȚ I. — *An. Inst. Patol. Ig. animală*, 1955, vol. 5, p. 199.

TOPLENINOVA F. K.A. — *Vop. Virusol.*, 1961, nr. 2, p. 174.

ZARNEA G. şi DINCULESCU M. — Metode serologice de diagnostic în tifosul exantematic, Ed. medicală, Bucureşti, 1954.

ZDRODOVSKI P. F. şi GOLINEVICI E. M. — Ucenie o rikketsiah i rikketsiozah, Medghiz, Moscova, 1953, p. 138.

ZILBER L. A. — Bazele imunologiei, Ed. medicală, Bucureşti, 1959.

* * * — Cold hemagglutinins in primary atypical pneumonia and other respiratory infections, *Amer. J. med. Sci.*, 1944, vol. 208, p. 742.

INFRAMICROBIOZE AL CĂROR DIAGNOSTIC ESTE MAI FRECVENT CERUT LABORATORULUI

DIAGNOSTICUL PRINCIPALELOR VIROZE ALE APARATULUI RESPIRATOR

Cercetările efectuate de specialişti au reuşit ca în ultimii ani să clasifice într-o bună măsură şi să diferenţieze etiologic o serie de îmbolnăviri care în trecut erau catalogate drept „gripă'' sau „stări gripale''.

Acest diagnostic care se baza exclusiv pe o serie de simptome comune era contestat în valabilitatea lui chiar de către infecţionişti, care, cu un bun simţ clinic, presimţeau şi adesea afirmau plurietiologia sindromului descris. Se simţea cu asiduitate necesitatea sprijinului laboratorului de virusologie, al unui laborator cu metode şi tehnici rapide şi eficace. Această contribuţie a venit suficient de repede, mai ales în urma răspîndirii largi a tehnicilor culturilor celulare. Fără nici o discuţie că încă nu s-a spus ultimul cuvînt şi că an de an se aduc date noi care lămuresc şi totodată uşurează diagnosticul etiologic al virozelor acute ale aparatului respirator.

Pînă în momentul de faţă, în linii mari, se poate afirma că s-au diferenţiat : gripa, guturaiul, adenovirozele , infecţiile produse de virusurile hemadsorbante, crupurile produse de virusurile C.A., „gripa'' de vară produsă de virusul *Coxsackie* (îmbolnăviri în special ale căilor aeriene superioare) şi o serie de îmbolnăviri cu un mai frecvent răsunet la nivelul plămînilor (pneumonii atipice primare — denumire eronată — produse de germeni PAP [1]; afecţiuni determinate de virusurile R.E.O.; pneumonia ornitozică, tifosul pulmonar — febra „Q'' — produs de ***Rickettsia burneti*** etc.); nu trebuie însă uitat că un sindrom pneumonic tipic poate fi determinat de oricare din inframicrobi cu „afinitate'' pentru arborele respirator.

Incontestabil că o delimitare perfectă nu se poate face, fiind cunoscute frecvente imixtiuni (de exemplu pneumonia gripală etc.).

Pentru marea majoritate a acestor afecţiuni virotice respiratorii, laboratorul de virusologie poate stabili astăzi corect diagnosticul; răspunsul său depinde însă în mare măsură, aşa cum s-a mai arătat, de colaborarea cu clinicianul şi cu epidemiologul; aceasta mai ales pentru că, pe baza diagnosticului de prezumţie, el poate alege cele mai adecvate tehnici de lucru.

În marea majoritate a acestor afecţiuni se vor folosi ca ***produse patologice:*** spălăturile nazofaringiene, secreţiile nazofaringiene, sputa şi sîngele periferic; suspiciunea unei etiologii *Coxsackie*, E.C.H.O. sau R.E.O. obligă şi la recoltarea paralelă de materii fecale.

Spălăturile nazofaringiene vor fi inoculate în oul de găină embrionat (gripă, ornitoză, febră „Q''), în culturi celulare (adenovirusuri, virusuri hemadsorbante, E.C.H.O., R.E.O.), la diferite animale de laborator (gripă, *Coxsackie*), şi vor fi folosite şi pentru unele probe biologice (reacţia de hemaglutinare). Materiile fecale vor fi inoculate la şoareci sugari (*Coxsackie*) şi în special în culturi celulare (E.C.H.O., R.E.O.) Sîngele va fi rar folosit pentru inoculări, curent însă pentru reacţii serologice; în acest caz se reaminteşte necesitatea probelor duble.

În cele ce urmează, se vor expune cîteva tehnici folosite mai curent pentru diagnosticul celor mai frecvente viroze respiratorii.

---

[1] După unii autori, încadraţi recent în grupul P.P.L.O.

DIAGNOSTICUL GRIPEI

Diagnosticul gripei se bazează pe metode de *izolare a virusului*, *pe metode serologice* și mai rar, pe *metode citologice*.

METODE DE IZOLARE A VIRUSULUI

Virusul gripal poate fi izolat de la bolnavi, exclusiv în perioada de invazie și de stare.

Produsele virulente folosite în mod obișnuit sînt secrețiile nazofaringiene, iar în formele intestinale, materiile fecale; la sugari se folosesc secrețiile nazale recoltate cu ajutorul tampoanelor de vată sau spălăturile gastrice. În cazurile necropsice, se prelevă exsudat traheal și bronșic, fragmente de trahee, fragmente de plămîn (din zona hepatizată) și, neobligator, fragmente de creier.

Produsele se recoltează în ser fiziologic, în sol. Hanks, cu sau fără adaos de bulion (āā). Transportul materialului se face la gheață.

Izolarea virusului se poate face pe animale de laborator (dihor, șoarece, hamster) și mai ales pe oul de găină embrionat.

Izolarea virusului la animale sensibile

Deși dihorul constituie animalul de elecție pentru izolarea virusului gripal, în laborator, ca animal de lucru uzual pentru acest virus se folosește șoarecele alb și mai rar hamsterul.

Indiferent de specia animală întrebuințată, materialul patogen care va fi inoculat trebuie să fie pregătit în prealabil.

Astfel, produsul de spălătură nazofaringiană este centrifugat 10 minute la 1 500 turații/min. și apoi lichidul supernatant tratat cu antibiotice (penicilină 2 000 u.i. și streptomicină 500µg/ml). Suspensia astfel pregătită este ținută 60 de minute la +4° și apoi inoculată.

Exsudatul faringian, centrifugat, este tratat cu antibiotice (în aceeași proporție ca cele indicate mai sus) și apoi folosit la inoculare.

Materiile fecale sînt omogenizate 1/10 în lichid diluant (recomandăm, în afara celor indicate, soluția Hanks) și centrifugate 15 minute la 3 000 turații/min. Se recoltează lichidul supernatant, se tratează cu antibiotice (doze duble) și după menținere 60 de minute la ghețar, este recoltat.

Sucul gastric recoltat prin tubaj de la sugari, la care spălăturile nazofaringiene nu se pot executa, este folosit ca atare, după centrifugare și tratare cu antibiotice (doze obișnuite).

Organele prelevate necropsic vor fi bine triturate, suspendate în cîțiva ml lichid diluant (diluție 1/10 la greutate) și centrifugate 10 minute la 1 500 turații/min. Lichidul supernatant, tratat cu antibiotice (suspensia de creier face excepție), va fi inoculat după 60 de minute de păstrare la ghețar.

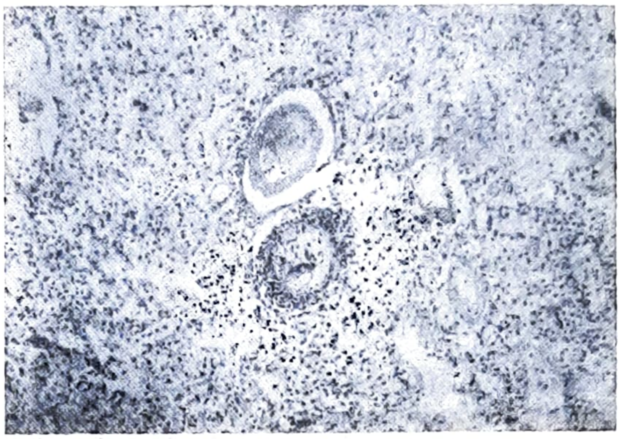


Fig. 523. — Aspectul microscopic al secțiunilor de plămîni provenit de la un șoarece mort cu pneumonie gripală experimentală (colorație Mann).

Inocularea la șoarecele alb. Deși în mod normal șoarecele face o gripă tipică numai după inocularea unui virus în prealabil trecut pe dihor, trebuie știut că există posibilitatea de a izola virusul direct pe șoarece, folosind metoda „pasajelor oarbe".

Cu fiecare produs patogen se inoculează, sub narcoză cu eter, pe cale intranazală, 4—6 șoareci[1]. La 2—3 zile de la inoculare, se sacrifică 3 animale.

Se recoltează steril plămînii, se triturează și se face în lichidul diluant o suspensie 1/10, care se prelucrează ca mai sus (centrifugare, adaos de antibiotice) și se inoculează intranazal la alte 4—6 animale. După 3—8 astfel de „treceri oarbe" se obține adaptarea virusului la specia șoarece. Virusul adaptat produce boala caracteristică la 48—96 de ore după inoculare. Animalul are părul zbîrlit, tremură, este somnolent, urinează mai des, devine dispneic. Dispneea se accentuează și animalul moare la 3—5 zile de la inoculare.

La necropsie, plămînii apar intens congestionați, hepatizați. Histologic se constată leziuni tipice de bronhopneumonie intensă. Trebuie subliniată existența unei necroze puternice a epiteliului bronșic, urmată de o descuamare aproape completă, ceea ce face ca bronhiolele terminale să apară foarte dilatate și goale (fig. 440).

---

[1] Se recomandă folosirea șoarecilor de 12—15 g

Izolarea virusului la șoarece se controlează prin reacții de hemaglutinare — hemaglutinoinhibare — și prin neutralizări cu seruri imune, standard.

Pentru treceri ulterioare, hemaglutinări etc., se vor folosi de asemenea plămînii animalului.

Izolarea virusului în oul de găină embrionat. Pentru inocularea oului embrionat se folosesc aceleași produse patogene ca și pentru infectarea animalelor de laborator. Este recomandabil însă ca adaosul de antibiotice să se facă în cantități mai mici (1 000 u.i. penicilină și 100 μg streptomicină).

Se folosesc ouă embrionate după incubare de 8—11 zile la +39°.

De reținut că pentru majoritatea tulpinilor de virus A, se obțin rezultate superioare cu embrioni în vîrstă de 10—12 zile, în timp ce pentru virusurile de tip B, mai ales cu embrionii de 8—10 zile.

Pentru izolarea unui virus gripal, inocularea se practică în cavitatea amniotică.

După inoculare, ouăle se mențin la temperaturi mai joase ca cele folosite pentru alte virusuri și anume la 37° pentru virusul A, la 35° pentru virusul B; pentru virusul gripal C se recomandă temperatura de 31,5—32°.

Ouăle se controlează zilnic la ovoscop, urmărindu-se mișcarea embrionilor. Embrionii morți în primele 24 de ore se exclud din experiență. Se păstrează în evidență numai embrionii ce supraviețuiesc acestui termen.

La 48—56 de ore, embrionii vii se sacrifică prin îngheț. După menținere 8—12 ore la ghețar, oul se deschide și se recoltează lichidul amniotic și alantoidian. Lichidele se prelevă și de la ouăle cu embrionii găsiți morți la minimum 48 de ore de la inoculare.

Lichidele recoltate sînt controlate din punctul de vedere al puterii hemaglutinante [1] și folosite pentru treceri ulterioare.

De altfel, cultivarea unui virus gripal în oul de găină embrionat se apreciază aproape exclusiv prin fenomenul de hemaglutinare, mai ales că modificările produse de acest virus la nivelul membranei corioalantoidiene și embrionului sînt de mică intensitate putînd uneori lipsi total.

Adaptarea unui virus gripal se obține pe oul embrionat în mod obișnuit după 2—5 pasaje.

Metode serologice

Probele serologice au aplicație în domeniul gripei fie pentru identificarea tipurilor de virus gripal din diferitele produse patogene sau izolate pe animal sau ou, fie pentru decelarea anticorpilor serici antihemaglutinanți, fixatori de complement sau neutralizanți.

Dintre numeroasele reacții propuse, în practica uzuală se folosesc: reacția de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare, reacția de fixare a complementului și, mai rar, reacția de seroneutralizare.

Reacția de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare

Reacția se folosește pentru punerea în evidență a factorului hemaglutinant în diferite produse patogene (lichide de spălătură nazofaringiană, lichide embrionare, suspensii de plămîn etc.), fie pentru descoperirea anticorpilor hemaglutinoinhibanți în serul bolnavului sau fostului bolnav.

Identificarea factorului hemaglutinant în anumite produse patogene. Reacția se execută după principiul și tehnica expuse anterior.

Ca antigene se folosesc produse de spălătură nazofaringiană, suspensii de plămîn de șoarece, lichide embrionare din oul infectat experimental etc.

Pentru suspensia de hematii 0,5% se folosesc, cu cele mai bune rezultate, eritrocitele de găină, de om (grup 0) sau de cobai.

Trebuie știut că un virus gripal poate să se găsească, după modul de aglutinare al hematiilor, în faze diferite (faza O sau D). F.M. Burnet și colab. au dovedit că un virus gripal la izolarea sa pe oul embrionat (faza O = originală) poate aglutina slab hematiile de găină și puternic cele de om și de cobai, pentru ca după o serie de treceri pe ou (faza D = derivativă) să aglutineze egal hematiile de găină, cobai și om.

Nu trebuie uitat că există hematii de găină neaglutinabile, precum și hematii care aglutinează spontan. În consecință, cînd se folosesc hematii de găină, este obligatoriu ca, înainte de efectuarea reacției, să se facă un control al aglutinării hematiilor pregătite, cu un virus gripal cunoscut.

---

[1] Se controlează fiecare produs într-un singur tub de hemoliză sau pe lamă, punînd o picătură de lichid, plus o picătură de suspensie de hematii de pui de găină.

Tehnica reacției este cea obișnuită, putînd fi executată în tuburi sau pe plăci cu godeuri.

Rezultatele reacției se citesc la o oră și jumătate.

Dat fiind că reacția de hemaglutinare poate fi pozitivă, datorită și altor factori (virusuri, microbi, enzime etc.), este obligatorie completarea reacției cu inhibarea hemaglutinării cu seruri imune, de tip.

În *reacția de hemaglutinoinhibare* se va lucra cu 4 unități hemaglutinante (de exemplu reacția pozitivă 1/320 = 1 u. hemaglutinantă; 4 u. hemaglutinante = diluția 1/80).

În reacția de hemaglutinoinhibare avem nevoie deci de o diluție fixă de antigen (4 u. hemaglutinante) și diluții crescînde de seruri imune, obișnuit de tip A, A_1, A_2 și B (Lee și England etc.).

Serurile cele mai bune se obțin pe cocoș, pe dihor, dar pot fi preparate și pe iepure sau hamster.

Prepararea serului pe cocoș. Se folosesc cocoși cu greutatea de 3 kg, în medie, la care serul obținut prin puncție cardiacă se dovedește a nu prezenta proprietăți hematoglutinoinhibante față de virusuri gripale. Pentru imunizare se folosește lichidul alantoidian recoltat din ouăle infectate experimental pe cale alantoidiană cu unul din tipurile de virus gripal, cu 2—3 zile în urmă. Se folosesc numai lichide cu titrul hemaglutinant de cel puțin 1/320.

Antigenul se inoculează intravenos (5 ml) și intraperitoneal (10 ml). Pentru tulpinile de virus gripal de tip A și B, inocularea se repetă a doua zi; pentru tulpina C este suficientă o singură inoculare și aceea cu doze mult mai mici (2,5 ml intravenos și 2,5 ml intraperitoneal).

La 10 zile de la inoculare cocoșul se sîngerează total. Se lasă sîngele să coaguleze și în cele mai bune condiții de sterilitate se foarfecă cheagul, după care se lasă în repaus, pînă a doua zi la gheţar, la 4°. Scos din gheţar, sîngele se menţine încă 6 ore la temperatura laboratorului după care se centrifughează. Se recoltează serul și se inactivează timp de 30 de minute la 56°. Serul obținut (considerat utilizabil numai la un titru inhibant de minimum 1/400 după îndepărtarea inhibitorilor nespecifici) se conservă după congelare, la —20° sau se liofilizează în fiole de 1 ml.

Serurile anti-C au titruri mult mai mari (pînă la 1/25 000) și sînt lipsite de inhibitori nespecifici față de acest tip de virus gripal.

Trebuie cunoscută calitatea inhibantă la titruri mari (1/10 000) a serului normal de șobolan față de hemaglutinina acestui tip de virus gripal (Stick).

Tehnica reacției de hemaglutinoinhibare pentru identificarea factorului hemaglutinant din produsul de diagnosticat este cea obișnuită, fiind executată în tuburi sau de preferință pe plăci de material plastic cu godeuri. Ea permite nu numai diagnosticul infecției gripale, dar chiar și a tipului antigenic al virusului în cauză.

O reacție de hemaglutinare pozitivă cu produse recoltate de la bolnav (spălături nazofaringiene, secreții nazale), de la animale, sau de la embrioni infectați experimental, inhibată de un ser antigripal, reprezintă un valoros element de diagnostic etiologic.

Diagnosticul gripei prin decelarea anticorpilor serici hemaglutinoinhibanți. Pentru punerea în evidență a anticorpilor hemaglutinoinhibanți în serul bolnavilor sau convalescenților, sînt necesare:

— serul bolnavului (de preferință 2 probe, una recoltată în faza acută și o a doua în convalescență);

— antigene standard;

— seruri imune de tip;

— suspensie de hematii 0,5%.

Sîngele bolnavului se recoltează steril (5—10 ml) în două reprize (la debut și în convalescență sau la începutul convalescenței și după 4 săptămîni), aceasta deoarece anticorpii hemaglutinoinhibanți apar între a 7-a și a 9-a zi de boală, titrul lor crescînd pînă în a 25-a zi, după care începe să coboare. Serul se inactivează 30 de minute la 56° și apoi este păstrat (în fiole închise) la frigider sau congelat.

Antigenele standard se prepară din tulpinile tip, cel mai comod pe embrionii de găină de 10—11 zile. Inocularea se face pe cale intraalantoidiană pentru tulpinile de tip A și B și pe cale intraamniotică, pentru tipul C.

După inoculare, ouăle infectate cu tulpinile A și B se mențin timp de 42—48 de ore la 35°, iar cele inoculate cu tulpina C, 26—30 de ore la 32°, după care embrionii sînt sacrificați prin înghețare (8—12 ore, la 4°).

Lichidele alantoidiene pentru tipurile A și B, lichidele amniotice pentru tipul C sînt recoltate steril și apoi, pentru fiecare tip în parte, reunite. Antigenele se diluează 1/4 în ser fiziologic $9^{0}/_{00}$, după care se adaugă mertiolat de sodiu sau potasiu în proporție de 1/10 000 și se conservă la gheţar la 4°, niciodată la temperaturi mai scăzute, la care se produce scăderea titrului hemaglutinant.

Dat fiind că în decursul conservării îndelungate se poate constata apariţia unor precipitate datorită uraţilor, înainte de întrebuinţare antigenul va fi centrifugat 10 minute la 2 000 — 3 000 turaţii/min., folosindu-se în reacţie numai lichidul supernatant.

Titrarea antigenului se face după tehnica obişnuită cu hematii de găină, cobai sau om (grup 0).

Trebuie ştiut că antigenul gripal C eluează rapid la temperatura camerei. Pentru aceasta, reacţia cu virusul gripal C se face la temperatura gheţarului, la 4°, de preferinţă cu hematii de om. Citirea reacţiei se face după 90 de minute.

Cercetătorii care prepară antigenele vor trebui să ţină constant seama de existenţa celor trei faze ale virusului gripal A, faza P, *Q* şi R, descoperite de Van der Veen şi Mulder.

În faza P, virusul reacţionează la un titru ridicat cu serul omolog şi la un titru scăzut cu un ser eterolog; în faza *Q* virusul reacţionează în titru scăzut chiar cu serul omolog; în faza R, extrem de rară, virusul reacţionează la titru înalt cu toate serurile.

Serurile imune, folosite obligatoriu pentru fiecare din antigenele introduse în reacţie, se prepară conform indicaţiilor date.

Reacţia de hemaglutinoinhibare în scop diagnostic se execută în acelaşi timp, cu cele 2 sau 3 probe de ser recoltate de la bolnavul respectiv, faţă de antigenele de tip şi subtip A şi B; antigenul de tip C va fi folosit numai în cazul unei reacţii negative cu antigenele de tip A şi B.

În timp de epidemie, se poate face iniţial o reacţie numai cu virusul izolat în perioada respectivă.

Diagnosticul de certitudine este dat de un titru minim de 1/320 sau de diferenţa evidentă dintre titrul anticorpilor hemaglutinoinhibanţi studiaţi în dinamica lor (creştere de 3—4 ori).

Reacţia de fixare a complementului. Deşi în mod curent nu permite stabilirea varietăţii tipului de virus, reacţia de fixare a complementului este recomandată ca una din metodele de elecţie pentru diagnosticul gripei (pozitivitate 80—90%). Pentru stabilirea subtipului de virus, rezultatele reacţiei de fixare trebuie completate cu reacţia de hemaglutinoinhibare.

Deoarece în serul bolnavilor din faza acută se găsesc cantităţi mici de anticorpi fixatori de complement, în timp ce în convalescenţă titrul lor este crescut, este necesară recoltarea a două probe de ser, una în timpul bolii şi o alta în convalescenţă. Deosebirea de titru dintre cele două probe va permite stabilirea diagnosticului.

Dat fiind că în gripă reacţia se face în prezenţa unor antigene solubile, pe baza anticorpilor care apar de timpuriu şi dispar repede, cea de a doua probă de ser va trebui recoltată la începutul convalescenţei sau la maximum 7—8 zile de la vindecarea clinică.

Reacţia care se execută după tehnicile curente foloseşte următorii reageni:

— antigene gripale (A, A_2, B etc.);
— antigene „normale";
— seruri imune standard;
— serul bolnavului (2 probe recoltate la 7—10 zile interval);
— alexină, sistem hemolitic lichid, diluant.

Dăm pe scurt cele mai simple tehnici de preparare a acestor reageni.

Antigenele se obţin pe oul embrionat sau pe şoarece cu tulpini verificate; cele mai bune rezultate sînt furnizate de ovoantigene.

Prepararea ovoantigenului. Se inoculează pe cale alantoidiană ouă embrionate de găină de 10—11 zile cu 0,1 ml lichid alantoidian recoltat recent din ouă infectate cu tulpini verificate, diluate în funcţie de titrul cunoscut.

După 24—48 de ore de incubare la temperatura optimă pentru fiecare tip antigenic, se recoltează membranele alantoidiene şi după ce se foarfecă, se suspendă în ser fiziologic (1 ml pentru fiecare membrană).

Tuburile cu suspensia virulentă se introduc într-un amestec congelant (alcool-zăpadă carbonică). După congelare, tuburile se dezgheaţă la temperatura laboratorului. Se fac 3 astfel de îngheţuri şi dezgheţuri consecutive, după care suspensia se centrifughează 15 minute la 3 000 turaţii/min. Se recoltează lichidul superficial şi se adaugă cloroform în proporţie de 2%. Se agită puternic şi se lasă peste noapte în repaus la temperatura gheţarului (4°).

A doua zi se recentrifughează aceeaşi perioadă de timp şi la aceeaşi viteză. Lichidul superficial constituie antigenul care se poate conserva la 4° sau de preferinţă după liofilizare.

Pentru virusul C se foloseşte ca antigen *lichidul amniotic* recoltat din ouă inoculate cu acest tip de virus.

Ovoantigenele astfel preparate sînt antigene solubile, specifice de tip şi nu de varietate de tip, deosebite de antigenul ataşat de particula virotică, cu o specificitate mult mai ridicată.

Antigenele normale se prepară întocmai din ouă embrionate de aceeaşi vîrstă, însă neinfectate.

Serurile imune se prepară pe cocoş, dihor sau iepure (de preferinţă pe cocoş).

Serurile de diagnosticat se obţin steril prin puncţie venoasă de la bolnavii acuţi şi convalescenţi, în două reprize (în perioada de stare şi în convalescenţă).

Serurile sînt inactivate 30 de minute la 56° şi apoi conservate, pînă în momentul întrebuinţării, congelate, la —20°. Reacţia se va executa în acelaşi timp cu ambele probe.

Alexina, sistemul hemolitic şi tehnica reacţiei urmează schema obişnuită.

De reţinut că din cercetările comparative efectuate la 37° şi la rece, s-a putut stabili avantajul fixării prelungite la 4°. După N. P. Korniuşenko această metodă permite o creştere de 3 ori a rezultatelor pozitive atît în ce priveşte frecvenţa, cît şi valoarea titrurilor.

Rezultatele reacţiei de fixare a complementului sînt de un real folos în diagnostic. Datele obţinute, în special prin studiul dinamicii anticorpilor serici, permit identificarea virozei, fără însă a putea stabili cu certitudine varietatea antigenică a virusului în cauză.

Pentru aceasta este necesară completarea diagnosticului cu datele furnizate de reacţia de hemaglutinoinhibare în prezenţa diferitelor tipuri de antigene.

Metoda anticorpilor fluorescenţi. În ultima vreme specialiştii îşi pun mari speranţe în folosirea anticorpilor marcaţi cu substanţe fluorescente pentru diagnosticul rapid al gripei. Rezultate încurajatoare au fost oţinute de Goldwasser şi Shepard, Balş, Nafta şi colab. etc. Deşi laborioasă, din cauza dificultăţilor întîlnite uneori în prepararea ingredientelor şi din cauza necesităţii folosirii a numeroşi martori, metoda prezintă avantaje, mai ales prin timpul scurt necesitat pentru precizarea unui diagnostic.

Dintre tehnicile propuse (,,directă pozitivă", ,,directă negativă", ,,indirectă" şi de ,,fixare de complement"), considerăm că rezultatele cele mai comode pentru laboratorul de diagnostic le furnizează *tehnica indirectă* şi de *fixare a complementului*.

Materialele necesare în fluorescenţă. În afara materialului necesitat de orice cercetare în fluorescenţă (vezi capitolul ,,Tehnica anticorpilor fluorescenţi"):

— Antigene gripale.
— Ser antiom (antiglobulinic).
— Ser anticobai.
— Serul de cercetat.
— Ser pozitiv (de convalescent), verificat.
— Alexină.
— Hematii de cocoş.

Antigenele gripale sînt constituite din lichidele amniotic sau alantoidian, recoltate din ouăle embrionate infectate în prealabil cu tulpini cunoscute de colecţie. Se vor întrebuinţa numai lichide cu un titru HA de minimum 1/320.

Serul antiglobulinic obţinut pe capră sau pe iepure cu concentrat de γ-globuline umane este prelucrat pentru a se extrage fracţiunea globulinică.

Serul nativ este tratat cu soluţie de sulfat de amoniu 40% saturat. Precipitatul este reluat în apă distilată şi operaţia se repetă, după care este supus dializei contra unei soluţii de clorură de sodiu 0,15 M, pînă ce lichidul de dializă nu mai conţine urme de sulfat.

Produsul final este diluat cu soluţia salină 0,15 M, pentru a se ajunge la o concentraţie de 1% proteine. Într-o fază următoare, produsul este cuplat cu substanţa fluorescentă (izotiocianatul de fluoresceină).

Serul anti-cobai este preparat pe iepure cu doze crescînde de ser cobai. Se extrage fracţiunea globulinică după acelaşi procedeu şi apoi este cuplată cu fluorocromul utilizat.

Serul de cercetat este folosit în diluţii binare în soluţia salină fiziologică 0,15 M, tampon-fosfat 0,01 M, pH = 7.

Serurile martore (pozitiv şi negativ) sînt prelucrate întocmai.

Tehnica de lucru este în general descrisă la capitolul ,,Tehnica anticorpilor fluorescenţi". De remarcat că antigenul gripal este folosit (aşa cum preconizează M. Balş şi colab.) după adsorbţie pe hematii de cocoş (suportul virusului). Contactul hematii cocoş + virus, în exces, se face la 4°.

Pe lame de sticlă lipsite de fluorescenţă se fac frotiuri circulare cu diametrul de 5 mm. Pe aceleaşi lame se fac şi frotiuri cu hematii neîncărcate cu virus.

Frotiurile realizate cu hematii cu virus şi hematii martor sînt acoperite cu diluţiile de ser, lăsate în contact 20 de minute şi după spălare, acoperite cu serul antiglobulinic-om fluorescent, diluat 1/8.

După 20 de minute preparatele se spală, se montează şi examinează (fig. 524).

Pe măsură ce se vor aduce îmbunătățiri și simplificări tehnicilor de preparare a reagenilor, metoda va găsi o extindere mai mare.

Aplicarea majoră a metodei în diagnosticul gripei o constituie însă tehnica de imunofluorescență în varianta folosirii frotiurilor de secreție nazală de la bolnavi, tratate cu seruri imune și colorare cu seruri antispecia producătoare a serului imun, cuplate cu substanțe fluorescente (Lin și colab.). Această variantă necesită, în afara reagenilor descriși *seruri antigripale* de tip, preparate de preferință pe cocoș și *seruri anti-cocoș* (antiglobulinice).

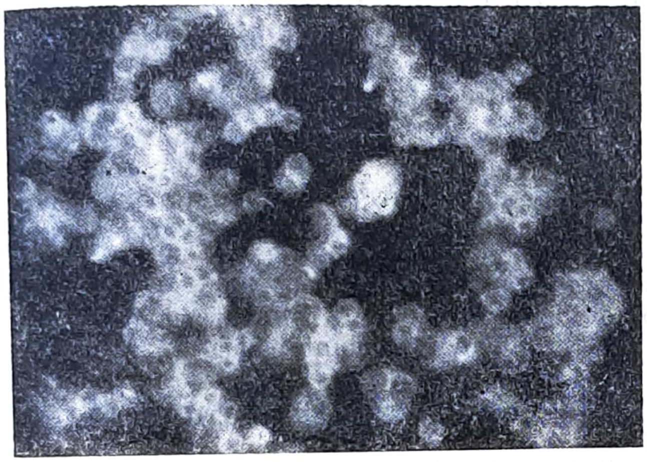


Fig. 524. — Virus gripal A pe membrană corioalantoidiană tripsinizată, infectată de 48 ore; ser antigripal A cuplat cu izocianat de fluoresceină; obiectiv imersie 90 (M. Balș, I. Nafta și colab.).

Prepararea lor, extragerea fracțiunii globulinice, cuplarea etc., se efectuează întocmai ca pentru celelalte seruri descrise mai sus.

În această variantă tehnica de lucru este cu totul asemănătoare:

Frotiurile cu celule din căile respiratorii superioare ale bolnavului acut sînt fixate în acetonă 10 minute, uscate la aer și folosite în tehnica indirectă: acoperire cu serurile antigripale de tip (fie pe lame separate, fie pe aceeași lamă pe care s-au făcut mici frotiuri depărtate, de celule nazale), contact 20 de minute la temperatura camerei, spălare, colorare cu ser anti-cocoș, fluorescent, contact 20 de minute, spălare, montare, examinare.

Rezultatele acestei variante sînt deosebit de spectaculoase, ele precizînd într-un timp extrem de scurt diagnosticul, din păcate însă numai într-o fază de debut a bolii.

În tehnica de *fixare a complementului* se procedează întocmai, numai că la serul de cercetat se adaugă și alexină de cobai (diluție 1/10), iar produsul fluorescent adăugat nu este serul anti-om, ci serul *anti-cobai.*

În tehnică se folosesc o serie de martori obligatorii:

— hematii neîncărcate cu virus + ser de diagnosticat + ser anti-om fluorescent;

— hematii încărcate cu virus + ser pozitiv + ser anti-om fluorescent;

— hematii încărcate cu virus + ser negativ + ser anti-om fluorescent;

— hematii încărcate cu virus + ser anti-om fluorescent;

— hematii încărcate cu virus + ser anti-cobai fluorescent;

— hematii încărcate cu virus + alexină + ser anti-cobai fluorescent.

Rezultatele se apreciază în comparație cu martorii (care trebuie să fie negativi).

Metode citologice

Studiul tabloului citologic al amprentelor de mucoasă nazală în cursul gripei a permis lui E. A. Coleadițkaia, pe baza modificărilor găsite, să propună *citorinodiagnosticul* ca o metodă de diagnostic precoce și mai ales cu valoare diferențială față de guturai.

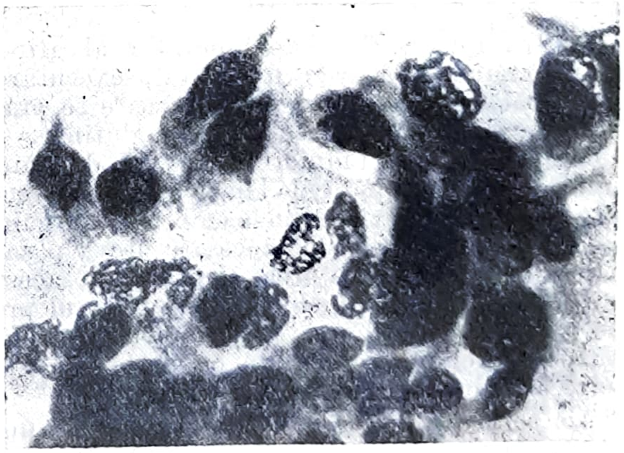


Fig. 525. — Amprentă de cornet inferior la un bolnav de gripă. Colorație Romanowski-Giemsa.

Tehnica citorinodiagnosticului este următoarea: cu ajutorul unei lame înguste de sticlă (0,5—0,7 cm × 8 cm), cu marginile perfect șlefuite (sau, dacă este rugoasă, cu marginile învelite în leucoplast), se atinge cornetul inferior, după dilatarea narinei cu un speculum nazal și îndepărtarea mucozităților din cavitatea nazală cu ajutorul unui tampon de vată uscată. Preparatele-amprente astfel obținute se colorează după metoda May-Grünwald-Romanowski-Giemsa, folosită în hematologie.

Examenul microscopic al preparatelor astfel colorate pune în evidență, în cazul gripei, în special în primele 3 zile de boală, un mare număr de celule epiteliale cilindrice, intacte, izolate sau grupate, și un foarte mic număr de leucocite polinucleare (10—20 pe un cîmp microscopic) (fig. 525). Prezența a numeroase celule epiteliale cilindrice a fost întîlnită de autoare în 96,3% din cazuri.

În afara acestor modificări, Koldobski a semnalat existența unor incluzii citoplasmatice situate în celulele epiteliale cilindrice.

Modificările semnalate sînt prezente în primele zile de boală, dar dispar după 7—10 zile de la debut. Spre deosebire de acest tablou citologic, în *catarurile acute sezoniere, în guturai* se întîlnesc extrem de rare celule cilindrice, cîmpul microscopic fiind acoperit aproape în întregime de leucocite polinucleare, limfocite și monocite, ca și de foarte rare eozinofile. Se găsesc, de asemenea, celule epiteliale plate izolate sau în placarde; incluziile lipsesc de regulă.

Concluzii

Pentru diagnosticul de laborator al gripei, se recomandă, în faza de debut, executarea unei spălături nazofaringiene din care se practică o reacție directă de hemaglutinare și inoculări pe cale amniotică, în oul de găină embrionat, sau pe cale nazală, la șoarece. Pentru adaptarea virusului la embrionul de găină sau la șoarecele alb sînt necesare cîteva pasaje oarbe (3—8). Dezvoltarea virusului în aceste gazde sensibile se controlează cu ajutorul probei de hemaglutinare. Orice hemaglutinare pozitivă trebuie completată cu proba de inhibare a hemaglutinării cu seruri imune.

In *perioada de debut* se va recolta și sînge pentru probe serologice (reacția de fixare a complementului și reacția de hemaglutinoinhibare).

Citorinodiagnosticul poate aduce date utile, în special pentru diferențierea de guturai.

In *perioada de stare* se procedează ca în perioada de debut. În această perioadă reacția de fixare a complementului este constant pozitivă.

In *perioada de convalescență* diagnosticul va fi precizat cu ajutorul testelor serologice, în special prin reacția de fixare a complementului. Creșterea anticorpilor serici în timp precizează diagnosticul, chiar tipul de virus, nu însă și variantele din cadrul tipului. Acest diagnostic de finețe este precizat de proba de hemaglutinoinhibare cu antigene standard.

In *cazuri necropsice*, diagnosticul va fi stabilit prin examenul histopatologic al plămînilor, prin încercări de izolare a virusului din secreții traheale și bronșice, ca și din suspensii de trahee, plămîn, creier. În același timp se vor face cu aceste produse reacții de hemaglutinare, iar reacțiile pozitive vor fi obligatoriu completate cu testul hemaglutinoinhibării.

DIAGNOSTICUL GUTURAIULUI

Guturaiul, viroză benignă care adesea pretează la confuzii cu gripa, ca de altfel și cu alte afecțiuni produse de diferite virusuri la nivelul căilor aeriene superioare, este produs de un germen inframicrobian insuficient studiat. Cercetările întreprinse au reușit să dovedească sigur transmisibilitatea lui la cimpanzeu (Dochez) și cu rezultate încă discutabile, cultivabilitatea în celule de plămîn embrionar uman (Andrewes) și chiar în oul de găină embrionat.

Pluralitatea virusurilor capabile să producă cataruri acute, realitate de necontestat, este cu siguranță cauza principală a confuziilor din acest domeniu și a inexistenței, pînă în momentul de față, a unor teste de diagnostic precis.

Din această cauză contribuția laboratorului la diagnosticul guturaiului este încă extrem de săracă.

Deși în cercetări recente s-a putut obține izolarea unor virusuri producătoare de guturai în culturi de celule de rinichi embrionar uman (Tyrrell și colab.), realizate cu un mediu nutritiv mai sărac în bicarbonat de Na, inconstanța rezultatelor pozitive face ca singurele probe recomandate să fie încă cele citologice, care permit numai un diagnostic diferențial cu gripa — citorinodiagnosticul și reacția Panthier (examen microscopic al spălăturii traheale la șoarecii inoculați de 24—72 de ore, pe cale nazală, cu lichidul de spălătură nazofaringiană practicată la bolnavul de diagnosticat).

DIAGNOSTICUL AFECȚIUNILOR RESPIRATORII PROVOCATE DE ADENOVIRUSURI

Din 1953, cînd Rowe și colab. au izolat din vegetațiile adenoide și amigdalele unor copii un virus cultivabil exclusiv în culturi celulare și care inducea un efect citopatic cu un caracter diferit în general de alte virusuri astfel cultivabile, numeroși autori au identificat în mai toate țările germeni inframicrobieni asemănători, din care mulți diferiți însă serologic. Cele peste 24 de tipuri serologice de astfel de virusuri constituie grupul virusurilor A.P.C. (amigdalită, faringită, conjunctivită) sau al adenovirusurilor, germeni cauzatori ai unor variate aspecte clinice, printre care, însă, cele mai multe cu răsunet la nivelul aparatului respirator.

Astfel, tipurile 3, 4, 7 și mai puțin 1 se întîlnesc cel mai des în afecțiunile respiratorii acute, tipurile 3, 5, 1, 2, în febrele faringoconjunctivale, tipurile 6, 8, 10, în conjunctivite, keratoconjunctivite etc. Sînt citate însă și rare cazuri de afecțiuni respiratorii produse și de alte tipuri antigenice sau de tipurile întîlnite mai frecvent în afecțiuni oculare și invers. Numeroase cazuri, considerate clinic gripă, guturai sau cataruri respiratorii, s-au dovedit a fi în realitate produse de diferite tulpini de adenovirusuri.

Posibilitatea de izolare curentă a acestor virusuri în culturi celulare, antigenul solubil de grup pe care-l conțin și care poate fi pus în evidență ușor, prin reacția de fixare a complementului, ca și antigenul specific de tip, identificabil prin reacția de neutralizare, constituie elemente valoroase, care permit astăzi un bun diagnostic de laborator. Acesta este de altfel simplificat prin aspectul „efectului citopatic", caracterizat în mare mai ales prin modificări particulare ale nucleului (degenerescență granulară și vacuolară, cu producere de „incluzii"), urmate de distrugerea celulei, neîntîlnit în mod obișnuit la ceilalți agenți citopatogeni cunoscuți pînă astăzi.

IZOLAREA VIRUSULUI

Ca *produs patogen* se folosesc în mod curent lichidul de spălătură nazofaringiană, fecalele, secrețiile nazofaringiene (excepțional suspensii de amigdale, vegetații, ganglioni limfatici).

Celulele preferate pentru culturi vor fi cele de origine umană (HeLa, KB, amniotice și embrionare umane) sau de origine simiană (rinichi). Trebuie cunoscut că cea mai mare parte a adenovirusurilor pot fi ușor izolate pe celulele de tip epitelial (HeLa, KB, amnios), în timp ce pe fibroblaștii de embrion uman există și tipuri care se adaptează ceva mai greu, necesitînd 1—2 pasaje oarbe. Din această cauză, mai ales cînd se folosesc celulele embrionare umane, în realitate foarte sensibile, sînt necesare a se face 1—3 treceri pentru a se afirma rezultatul.

Prepararea celulelor și inocularea lor se face după tehnicile obișnuite.

După inoculare, tuburile se mențin staționar la 37°, iar controlul se face la 48 și 96 de ore, 7 și 8 zile. Aceasta, deoarece unele tipuri de adenovirusuri produc efectul citopatic ceva mai lent (în medie 3—7 zile). În celulele de tip epitelial, efectul citopatic apare însă mai repede ca în cele fibroblastice.

Efectul citopatic produs de adenovirusuri este, după cum s-a mai precizat, în mare măsură caracteristic acestui grup, deosebirile față de modificările citopatice produse de alte virusuri fiind mai evidente însă prin studiul celulelor fixate și colorate cu una din metodele curente : hematoxilină-eozină, albastru de metil oxalatat, fucsină acidă oxalatată etc.

În general însă se constată rotunjirea celulelor și gruparea lor sub formă de ciorchine, urmată de desprinderea de pe sticlă (tipurile 1, 7, 11, 12, 14, 16) sau de menținerea, la suprafața stratului celular, a unor celule degenerate, rotunde, izolate (tipurile 9, 10, 13, 15, 17); adesea se constată însă și o creștere a taliei unor celule, care capătă o formă neregulată, cu transformarea ulterioară în sfere granulare urmate de picnoză.

De remarcat că celulele lezate refractă lumina mult mai puternic ca cele normale. Pe preparatele colorate, modificările cele mai importante se întîlnesc la nivelul nucleilor.

Într-adevăr, în masa cromatinei apar formațiuni rotunde, ovale sau alungite, bine delimitate, eozinofile la început, bazofile într-un stadiu mai avansat, înconjurate de o zonă clară, asemănătoare cu incluziile celulare. Formațiunile nucleare, la început izolate, se unesc în blocuri mai mari, conținînd mici vacuole care le dă chiar un aspect de fagure. În interiorul nucleului, independent de aceste formațiuni, apar numeroase vacuole de talie variată, cu un conținut omogen, hialin, oxifil. Într-o fază finală, blocul nuclear se lobează, se retractă, iar vacuolele conţinute devin din ce în ce mai mari (fig. 526).

Conturul nuclear neregulat lipseşte pe alocuri. În această fază, citoplasma este de asemenea retractată.

Este interesant de constatat şi aspectul nucleolului, care în culturile infectate cu adenovirusuri, spre deosebire de alte virusuri, este nealterat, ,,îşi păstrează poziţia şi structura şi poate fi uşor recunoscut chiar în celulele aflate într-un stadiu avansat de leziune'' (Aderca şi colab.).

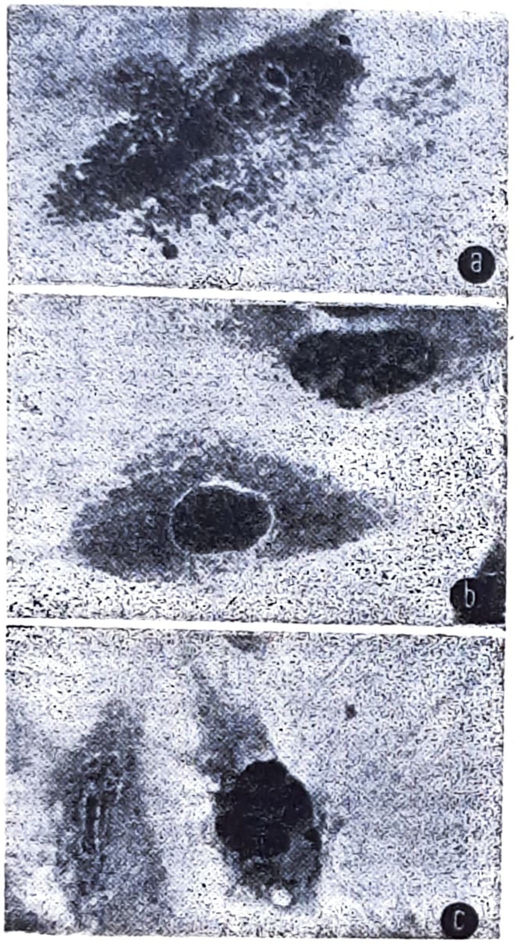


Fig. 526. — Diferite aspecte ale efectului citopatic determinat de adenovirusuri în culturi de celule embrionare umane.

a şi *b* — formaţiuni granulare nucleare; *c* — puternică vacuolizare a masei nucleare.

Deşi aspectul efectului citopatic constituie un important element pentru diagnosticul diferenţial al infecţiei cu adenovirusuri, orice izolare pozitivă va trebui confirmată prin reacţii serologice (reacţia de fixare a complementului şi reacţia de neutralizare).

Metode serologice

Dintre probele serologice recomandate în diagnosticul adenovirozelor uzual se practică reacţia de fixare a complementului (caracter de grup) şi reacţia de seroneutralizare (caracter de tip). Prima din aceste reacţii (R.F.C.) este folosită fie pentru precizarea apartenenţei unui virus izolat în culturi celulare la grupul adenovirusurilor, fie pentru diagnosticul specific propriu-zis al bolnavului (mai ales prin aprecierea în dinamică); cea de a doua reacţie (R.N.) este folosită aproape exclusiv pentru precizarea tipului serologic al virusului izolat.

Reacţia de fixare a complementului. *Produse necesare* pentru identificarea unui virus izolat:

— ser imun verificat;
— tulpină de virus izolată;
— tulpină de adenovirus cunoscută;
— alexină, sistem hemolitic, diluant etc.

Serul imun pentru reacţia de fixare a complementului se prepară în laborator, de preferinţă pe iepuri cu oricare din tipurile antigenice de adenovirus pe care le posedă laboratorul.

Cu bune rezultate se poate folosi următoarea schemă de imunizare a iepurilor:

Materialul virulent (supernatantul mediului nutritiv extras din culturile de celule infectate în momentul unui puternic efect citopatic), îngheţat, dezgheţat şi centrifugat 10 minute la 3 000 turaţii/min.[1] este administrat animalului pe cale intravenoasă, în 5 doze de cîte 1,5 ml la 4 zile interval.

La 5 zile de la ultima injecţie se face un rapel cu 5 ml pe cale peritoneală, iar după alte 7 zile animalul este sîngerat. Serul obţinut, inactivat 30 de minute la 56°, este spălat şi păstrat la gheţar de preferinţă la congelator.

Tulpina de virus izolată este transformată simplu în *antigen* pentru R.F.C.

Mediul nutritiv recoltat din tuburi de cultură, în momentul unui intens efect citopatic, este supus îngheţului şi dezgheţului de 3 ori consecutiv şi apoi centrifugat 10 minute la 3 000 turaţii/min. Lichidul superficial constituie antigenul care se conservă prin congelare. Unii autori recomandă folosirea antigenului după o menținere de 30 de minute la 56°, în scopul evitării riscului de îmbolnăviri accidentale.

---

[1] Recent, Dreizin a recomandat o tehnică şi mai simplă pentru prepararea antigenului: tulpina de adenovirus este cultivată în celule HeLa sau KB. După apariţia E.C.P. maxim, culturile se lasă încă 24 de ore la 37° şi apoi sînt îngheţate rapid la —40°. Se dezgheaţă la baia de apă. Îngheţul şi dezgheţul se repetă de 5—6 ori şi apoi produsul se centrifughează 30 de minute la 500 de turaţii/min. Lichidul supernatant constituie antigenul.

Antigenul standard se obține în aceleași condiții din tulpini de virus de colecție.

Alexina, sistemul hemolitic se pregătesc după tehnicile curente, iar reacția se execută după oricare din tehnicile descrise pentru studiul virusurilor, de preferință la rece.

Rezultate. Datorită antigenului solubil cu specificitate de grup, o reacție pozitivă va permite stabilirea apartenenței virusului izolat la grupul adenovirusurilor, element util și suficient diagnosticului clinic.

Pentru tipizarea virusului se vor face în continuare probe de neutralizare cu seruri pregătite pentru fiecare tip serologic în parte.

Folosirea reacției de fixare a complementului în scop diagnostic. În practica uzuală, punerea în evidență în serul bolnavilor a anticorpilor fixatori de complement, în prezența antigenului solubil cu specificitate de grup, are o importantă aplicație practică. Creșterea titrului anticorpilor în timp întărește valoarea diagnostică a R.F.C., ceea ce recomandă studiul în dinamică.

Trebuie arătat însă că în adenoviroze apariția anticorpilor fixatori de complement are loc tardiv (15—20 de zile de la debut); acest fapt dă reacției mai mult o valoare epidemiologică, diagnosticul fiind pus cu mult timp după vindecarea bolnavului. Reacția permite totuși aprecierea etiologiei unei izbucniri epidemice (este adevărat mai puțin ca izolarea virusului), precum și importante concluzii epidemiologice.

În reacție, serul de bolnav se obține și se pregătește după tehnica uzuală (inactivare 30 de minute la 56° etc.).

Antigenul standard este pregătit, după indicațiile date mai sus, din tulpini reprezentative (tipul 4 spre exemplu).

Serul imun standard se prepară pe iepuri, de asemenea după tehnica descrisă.

Prepararea celorlalți reageni, ca și tehnica reacției urmează indicațiile curente.

Rezultate. După cum s-a precizat, o reacție pozitivă, dar mai ales o creștere în timp a titrului anticorpilor F.C., poate stabili diagnosticul de infecție adenovirotică. Studiul anticorpilor în dinamică apare util, mai ales datorită valorii de grup al reacției și existenței unui mare număr de tipuri antigenice care nu imunizează între ele.

Reacția de seroneutralizare. Ca în mai toate virozele, această reacție este folosită mai mult pentru precizarea tipului virusului izolat și în mod excepțional pentru diagnosticul propriu-zis.

Reacția se efectuează în culturi celulare, necesitînd următoarele elemente:

— tulpina de virus izolată;

— seruri imune (pentru diferite tipuri antigenice);

— culturi celulare;

— medii nutritive, lichid diluant etc.

Dat fiind că atît prepararea suspensiei virulente de identificat (mediul nutritiv recoltat din tuburile infectate în momentul unui maxim efect citopatic), cît și a celorlalți reageni se efectuează după tehnicile curente, ne vom rezuma în a descrie numai cîteva amănunte privind motoda de lucru.

Aceasta este cu totul obligatorie, dat fiind numărul extrem de mare de seruri-tip, necesare în reacție.

Într-adevăr, existența certă pînă în momentul de față a cel puțin 24 de tipuri serologice distincte face ca în practica uzuală tipizarea unui adenovirus izolat să reprezinte o problemă dificilă.

Pentru aceasta se recomandă fie tipizarea inițială numai cu serurile tipurilor celor mai reprezentative pentru sindromul clinic respectiv (în cazul afecțiunilor respiratorii acute 3, 4, 7), fie a se încerca folosirea metodei de lucru cu amestecuri de seruri (metoda Lim și Melnick sau Schmidt).

După obținerea unui rezultat pozitiv cu unul din amestecuri, se poate trece pentru identificarea virusului la testarea separată față de fiecare ser din amestecul pozitiv.

În condiția existenței unor seruri cu potențial mare care să permită diluarea, se poate folosi excelenta tehnică introdusă de Lim și Melnick pentru tipizarea virusurilor E.C.H.O. sau cea propusă de Schmidt și colab.

Cît privește tehnica propriu-zisă a reacției de seroneutralizare, ea se face după schema obișnuită, prin inocularea fiecărui amestec de virus (100 DIC_{50}) + serul respectiv (anterior tratat), după o menținere de 60 de minute la temperatura laboratorului, în cîte 2 tuburi de cultură de celule (HeLa, KB sau embrion uman), neomițînd bineînțeles martorii cu totul indispensabili.

Citirea se face la 48—96 de ore, 7 și 8 zile.

Dat fiind că unele tipuri de adenovirusuri se dezvoltă mai greu, s-a propus ca reacția să fie apreciată definitiv la 14 zile, avînd grijă ca la 7 zile să se schimbe mediul de menținere.

Deși s-a susținut de către unii specialiști folosirea testului de culoare, dezvoltarea mai lentă a adenovirusurilor nu recomandă metoda, care poate fi generatoare de erori.

Reacția de hemaglutinare. Cu titlu informativ, semnalăm că Friedman și Bennett au recomandat folosirea pentru diagnostic a unei reacții de aglutinare a hematiilor de berbec tanate și sensibilizate cu diferite tipuri de virusuri A.P.C. Prin rezultatele inconstante obținute, această reacție de hemaglutinare indirectă nu a putut intra în practică, cum de altfel nu a intrat în uzul laboratorului nici metoda hemaglutinării și hemaglutino-inhibării pentru diagnosticul infecțiilor adenovirotice, deși, din cercetările lui Rosen și colab., ca și ale altor autori, numeroase tulpini de adenovirusuri reușesc să aglutineze hematiile maimuțelor *Rhesus* și *Certopithecus*, șobolanilor, șoarecilor și omului.

Concluzii

Pentru infecțiile produse de adenovirusuri și în special pentru cele cu răsunet la nivelul aparatului respirator, diagnosticul se bazează pe *izolarea virusului specific* și pe *reacții serologice.*

Izolarea virusului se face exclusiv pe celule cultivate *in vitro* și în special pe celule HeLa, KB, amniotice și embrionare umane sau pe celule renale de maimuță.

Efectul citopatic produs în aceste celule de adenovirusuri este în mare măsură diferit de cel indus în astfel de culturi de alte virusuri citopatogene, ceea ce permite de la început un diagnostic de prezumție. Apartenența virusului izolat la grupul adenovirusurilor va fi stabilită cu ajutorul R.F.C., folosind ca antigen virusul izolat, iar ca ser imun un ser preparat pe iepure cu o tulpină reprezentativă din grup. Tipul virusului va putea fi stabilit exclusiv prin reacția de seroneutralizare.

Pentru diagnosticul serologic se recomandă R.F.C. urmărită în dinamică, reacție care permite diagnosticul de infecție adenovirotică, fără precizarea tipului serologic al virusului, element suficient pentru practica uzuală.

DIAGNOSTICUL INFECȚIILOR CU VIRUSURI PARAGRIPALE

Pe baza datelor acumulate de diferiți cercetători care au descris noi tipuri de virusuri izolate de la adulți și în special de la copii cu afecțiuni respiratorii acute (Chanock și colab.), comitetul de experți pentru infecțiile respiratorii din cadrul O.M.S.-ului a propus includerea virusurilor noi, înrudite prin anumite proprietăți, într-un grup aparte, *grupul virusurilor paragripale.*

Caracterul comun al virusurilor din acest grup îl constituie *calitatea hemadsorbantă* pusă în evidență pentru prima oară de Vogel (1958).

În grupul virusurilor paragripale au fost incluse :

1. virusul Senday și virusul hemadsorbant 2 (HA_2);
2. virusul crupului (C.A.);
3. virusul hemadsorbant 1 (HA_1);
4. virusul sincițial (C.C.A.).

Aceste virusuri care produc în special la copii îmbolnăviri acute ale aparatului respirator de gravitate variată (faringite, pseudocrupuri, bronhopneumonii) au putut fi izolate în mai toate țările. În R.P.R. virusuri paragripale au fost izolate de Tărchilă și colab., Bronițki și colab. etc.

Diagnosticul unei infecții determinate de germeni din acest grup poate fi stabilit prin *izolarea virusului* și prin *metode serologice.*

Izolarea virusului. Izolarea virusurilor paragripale se realizează exclusiv în culturi celulare (celulele cele mai sensibile fiind celulele renale de embrion uman și celulele renale de maimuță).

Ca material patogen de la bolnavi se folosește exsudatul faringian, iar de la cazurile mortale fragmente de trahee, plămîn, suspendate în soluție Hanks, cu adaos de antibiotice (penicilină, streptomicină, micostatin). Produsele trebuie inoculate cît mai repede după recoltare.

Culturile de celule recomandate sînt cele de maimuță și în special celulele renale provenite de la fetuși umani — 12—30 săptămîni (A. A. Smorodințev).

După infectarea celulelor, controlul prezenței virusului se efectuează prin examenul microscopic (deși apariția unui efect citopatic este cu totul excepțională în primele treceri) și în special prin *testul de hemadsorbție* (Vogel, Chanock etc.).

Cu toate că fenomenul de hemadsorbție nu este limitat exclusiv la virusurile paragripale, el constituie un excelent indicator pentru diagnostic.

Tehnica hemadsorbției este simplă :

Se folosește o suspensie sterilă de eritrocite de cobai 0,4 %. În fiecare tub de cultură se adaugă 0,3 ml suspensie hematii după care tuburile se menţin 20 de minute la 4°. După acest timp se îndepărtează mediul, se spală o dată sau de două ori cu soluţie Hanks, se examinează la microscop. În cazul hemadsorbției pozitive se constată că eritrocitele sînt grupate în cîmpuri pe substratul celular, în timp ce într-o reacţie negativă eritrocitele sînt omogen repartizate. Culturile care s-au arătat negative din acest punct de vedere sînt alimentate din nou cu mediul nutritiv (de preferat mediu 199 cu 20% ser de viţel) şi recontrolate, prin acelaşi procedeu, la intervale de 4 zile.

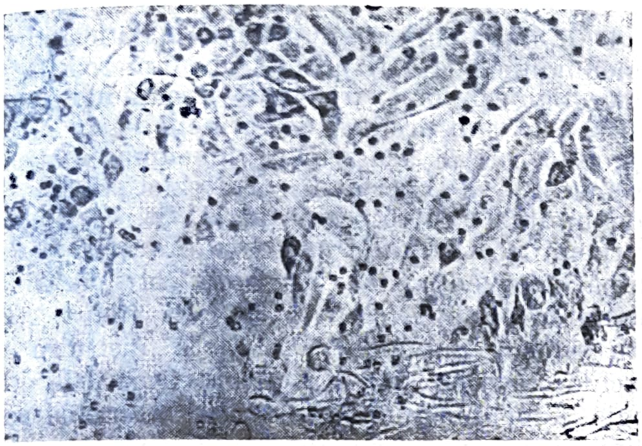


Fig. 527. — Hemadsorbţie negativă în culturi de celule renale de maimuţă, × 90 (V. Monaci).

Se recomandă totodată efectuarea de treceri oarbe, atît calitatea hemadsorbantă, cît şi efectul citopatic propriu-zis putînd deveni evidente abia după 2—4 treceri.

Cît priveşte efectul citopatic, după Bukrinskaia, el apare caracteristic pentru fiecare virus paragripal.

Astfel virusul HA_1 ar induce apariţia de celule alungite şi formarea de cîmpuri sinciţiale multinucleate.

Virusul HA_2 ar determina apariţia de celule mici, rotunde granulare, cu limite nete.

Virusul C.A. ar produce o distrucţie celulară, însoţită de apariţia unor numeroase soluţii de continuitate cu aspect de „şvaiţer'' şi aspect de sinciţii în burete.

Virusul Senday ar determina mai rapid ca celelalte virusuri din grup un efect citopatic caracterizat prin celule caudate cu 2—3 sau mai multe prelungiri, producînd în final distrucţia totală a culturii.

După izolare, virusul poate fi perfect tipat prin tehnica neutralizării sau, mai simplu, prin testul hemaglutinoinhibării.

Într-adevăr, s-a dovedit că atît anticorpii neutralizanţi, cît şi cei hemaglutinoinhibanţi pot să identifice cu uşurinţă virusul paragripal izolat.

Proprietatea hemaglutinantă a virusurilor paragripale faţă de eritrocitele de cobai, om (grup 0) şi cocoş constituie, de asemenea, un preţios adjuvant al diagnosticului etiologic.

Metode serologice

Tehnicile serologice cu valoare în acest grup, reacţia de neutralizare, reacţia de hemaglutinare şi hemaglutinoinhibare şi R.F.C., sînt utile atît pentru identificarea virusului izolat cît şi pentru diagnosticul propriu-zis.

Reacţia de neutralizare este folosită aproape exclusiv pentru identificarea agentului izolat în culturile celulare. Reacţia de neutralizare se execută după tehnicile uzuale cu seruri imune obţinute pe iepure sau cobai.

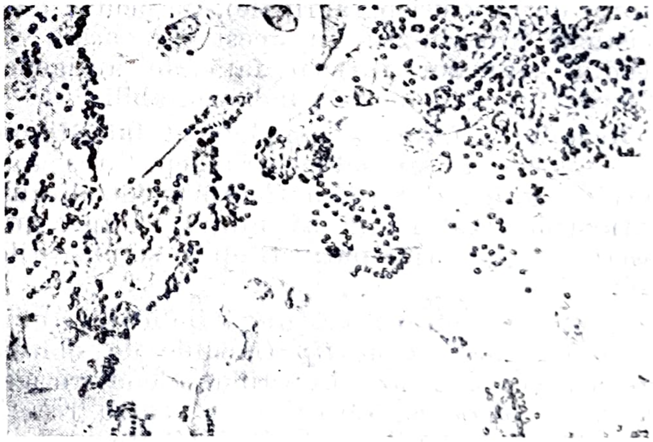


Fig. 528. — Hemadsorbţie pozitivă în culturi de celule renale de maimuţă infectate cu virusul hemadsorbant 1 (HA_1) × × 90 (V. Monaci).

O bună schemă de imunizare foloseşte inocularea intramusculară în 2 reprize, la interval de 3 săptămîni, a unui amestec, în părţi egale, de antigen viral (mediu nutritiv din culturile pozitive), cu amestec adjuvant (ulei de parafină 9 părţi + lanolină 1 parte). Serul obţinut are un titru neutralizant de 1/80—1/320.

Trebuie atrasă atenția asupra necesității lucrului cu material virulent proaspăt, întrucît la gheţar virusurile paragripale își pierd foarte repede activitatea.

În cazul folosirii metodei de neutralizare pentru diagnosticul serologic propriu-zis, se va lucra cu virus de colecție, întreținut în culturi celulare și numai cu seruri perechi.

Reacția de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare. Deși virusurile paragripale au slabe calități hemaglutinante pentru unele eritrocite (cobai, om grup 0, cocoş), în special pentru cele de *cobai*, această proprietate a fost repede folosită de laboratorul de diagnostic.

Suspensia de hematii care furnizează cele mai bune rezultate este de 0,5% (se recomandă hematiile de cobai).

Serul hemaglutinant se obține în cele mai bune condiții pe iepure, cobai sau şobolan, după tehnica descrisă mai sus pentru serul neutralizant.

Tehnica reacției de HA și HAI este cea obișnuită. Se va lucra cu un volum de 0,4 ml; temperatura optimă pentru efectuarea reacției este de 20° (A. A. Smorodinţev Jr.).

Metoda este folosită fie pentru identificarea unui virus izolat în culturi de celule (în acest caz se va lucra cu seruri imune față de diferitele tipuri de virusuri paragripale), fie pentru diagnosticul propriu-zis. În acest din urmă caz studiul serurilor perechi față de antigenele diferite paragripale este indispensabil.

Reacția de fixare a complementului. Metoda este folosită în special pentru depistarea anticorpilor serici. Față de anticorpii neutralizanți, anticorpii fixatori au avantajul că apar mai devreme și persistă puțin timp în serul foștilor bolnavi.

Reacția se efectuează după indicațiile obișnuite cu *antigene de tip* (mediile de cultură pregătite ca și în cazul infecțiilor adenovirotice). *Serurile imune* se obțin ca și pentru reacția de neutralizare și hemaglutinoinhibare.

Concluzii

Diagnosticul unei infecții produse de virusuri paragripale se stabilește prin izolarea virusului în culturi de celule (se recomandă folosirea celulelor renale de fetus uman) și decelarea multiplicării virusului prin proba de hemadsorbție.

Virusul izolat va putea fi identificat cu ajutorul reacțiilor de seroneutralizare și hemaglutinoinhibare.

Pentru diagnosticul serologic se recomandă reacția de hemaglutinoinhibare sau reacția de fixare a complementului, efectuate cu seruri perechi.

DIAGNOSTICUL UNEI PNEUMONII INFRAMICROBIENE

Deși, după cum am mai semnalat, un sindrom pneumonic poate fi produs de numeroși inframicrobi, cel mai frecvent pneumoniile zise ,,virotice'' sînt produse de germeni de tip P.A.P. (producători ai așa-ziselor ,,pneumonii atipice primare''), de germeni ornitozici-psittacozici (denumiți de către școala acad. Şt. S. Nicolau germeni P.A.M., *Pararickettsia avia-mamalia*, după frecvența lor crescută la păsări și mamifere), de *Rickettsia burneti* (febra ,,Q'' sau tifosul pulmonar); această înșiruire nu exclude participarea și a altor virusuri la etiologia unor pneumonii cu totul asemănătoare clinic (virusurile gripale, în special adenovirusuri, tipurile 1, 3, 4 și 7 sau virusurile E.C.H.O., tipurile 3, 4, 7, virusurile R.E.O. [1] etc.).

Dat fiind că pentru diagnosticul unei pneumonii gripale, adenovirotice etc., diagnosticul se face întocmai ca pentru afecțiunile respective tipice după metodele care au fost descrise la capitolele speciale, în cele ce urmează vom descrie diagnosticul pneumoniei atipice primare, al ornitozei și al febrei ,,Q'' (tifosul pulmonar).

DIAGNOSTICUL ,,PNEUMONIEI ATIPICE PRIMARE'' (P.A.P.)

Diagnosticul de laborator al P.A.P.-ului se stabilește în mod curent pe baza unor teste serologice: reacția de aglutinare la rece și reacția de aglutinare a streptococului MG. Recent, Chanock a arătat că germenul caracteristic aparține grupului P.P.L.O. și că în consecință, inconstant, poate fi izolat pe medii cu agar. Cu antigenul preparat din germenul izolat pe astfel de medii, se pot pune în evidență anticorpii fixatori de complement.

Reacția de aglutinare la rece se efectuează după indicațiile descrise la capitolul respectiv.

Rezultate. Datorită faptului că aglutininele la rece nu au, așa cum de altfel s-a precizat, o specificitate absolută (fiind întîlnite uneori și în alte afecțiuni), o reacție pozitivă va trebui interpretată cu rezervă.

---

[1] Virusuri respiratorii — enterice — orfane (Sabin, 1959), cu 4 tipuri antigenice distincte: Lang, D_5 Johnes, Deering și Abney.

Cu toate acestea, prezența crioaglutininelor în titruri superioare de 1/32, dar în special creșterea în timp a acestui titru sau scăderea lui la 5–6 săptămîni după boală constituie elemente cu importantă valoare diagnostică.

În consecință studiul dinamic al aglutininelor la rece este indispensabil. Nu trebuie uitat că reacția este pozitivă în 35–80% din cazuri, fiind proporțională direct cu gravitatea clinică.

Reacția de aglutinare a streptococului MG. Thomas și colab. au semnalat că streptococul MG (denumit astfel după bolnavul cu P.A.P. de la care a fost izolat, apoi frecvent izolat și de la indivizi „normali" și înrudit serologic cu *Str. salivarius*, tip I) poate fi aglutinat de serurile a 35–60% din convalescenții de pneumonie atipică primară.

Materialele necesare sînt următoarele:

— culturi de 18 ore de streptococ MG;

— ser fiziologic;

— aglutinoscop;

— tuburi de hemoliză, pipete de 2 ml, pipete de 5 ml etc.

Tehnica reacției. Se așază într-un stelaj 8 eprubete de hemoliză. Începînd cu tubul al doilea se pipetează în fiecare eprubetă cîte 0,5 ml din lichidul diluant. Separat, se prepară într-o eprubetă o diluție 1/10 din serul de cercetat în soluție de NaCl 8,5‰. Din această diluție se pipetează în primul și al doilea tub cîte 0,5 ml. Din al doilea tub, după barbotare, se trec 0,5 ml în al treilea tub și așa mai departe, pînă în tubul nr. 7. Din acesta, cei 0,5 ml în exces se aruncă. Într-un timp următor, se pipetează în toate tuburile cîte 0,5 ml dintr-o suspensie în soluție de NaCl 8,5‰ a unei culturi de 18 ore a streptococului MG, omorîtă prin căldură, spălată de 3 ori, diluată pentru a corespunde tubului nr. 5 din scara Mc Farland.

Se agită și apoi tuburile se introduc pentru 2 ore la 37° și apoi 18 ore, la gheţar.

După acest timp stelajul cu tuburi se reintroduce pentru 2 ore la 37°, după care se face citirea cu ajutorul aglutinoscopului.

Rezultate. În 35–60% din cazurile de pneumonie atipică primară, reacția este pozitivă în convalescență la un titru de cel puțin 1/20. La 4–5 săptămîni de la debut, aglutininele anti-MG ating titrul maxim. De remarcat că rezultatele pozitive sînt direct proporționale cu gravitatea formei clinice. Nu există paralelism între titrul aglutininelor MG și al crioaglutininelor.

Probe suplimentare. În cercetări efectuate într-o serie de cazuri de P.A.P. care au evoluat în țara noastră, în anii 1949–1950, am pus în evidență în serul bolnavilor de P.A.P. aglutinine anti - *Proteus* OX_{19} (R. Weil-Felix pozitivă în titruri semnificative). Aceste rezultate care par a fi datorite unor fracțiuni antigenice comune *Proteus* - ului OX_{19}, streptococului MG și pararickettsiilor justifică folosirea reacției Weil-Felix ca o reacție adjuvantă în diagnosticul de laborator al pneumoniei atipice primare.

Concluzii

Diagnosticul unei pneumonii atipice primare se poate stabili prin reacția de aglutinare la rece și reacția de aglutinare a streptococului MG.

Reacțiile pozitive, deși lipsite de specificitate absolută, constituie elemente extrem de utile diagnosticului, atunci cînd se prezintă în titruri semnificative (peste 1/32 în reacția de aglutinare la rece și peste 1/20, în reacția MG), dar mai ales prin evidențierea unei creșteri în timp a titrului aglutininelor respective.

În sprijinul diagnosticului se poate folosi și R.F.C. cu antigene preparate cu germeni izolați pe mediile cu agar, precum și reacția Weil-Felix.

În faza de debut a bolii se poate încerca izolarea germenului pe medii pe bază de agar.

DIAGNOSTICUL ORNITOZEI

Diagnosticul de laborator al pneumoniilor ornitozice apare din ce în ce mai util, datorită faptului că în ultimii ani numeroși cercetători au descris incidența neașteptat de crescută a acestor germeni în etiologia pneumoniilor inframicrobiene (D. Sărățeanu și colab., V. Bușilă și colab., Brauner și colab.).

Diagnosticul ornitozei apare cu atît mai important, cu cît, în cercetări recente, P. Giroud și colab., Șt. S. Nicolau și colab. au semnalat rolul deosebit al acestor germeni pararickettsieni și în producerea a numeroase afecțiuni cardiovasculare (infarcte de miocard, arterite etc.) și chiar a unor cazuri de ulcere gastrice și duodenale, iar M. Cajal și colab. au subliniat relațiile dintre acești germeni și avorturile spontane, malformațiile congenitale etc.

Răspîndirea inframicrobului în cauză, extrem de des întîlnit la păsări şi mamifere, a determinat pe acad. Şt. S. Nicolau şi colab. să propună pentru el denumirea de *Pararickettsia aviamamalia* — P.A.M.

Pentru diagnosticul infecţiilor cu P.A.M. laboratorul foloseşte metode de izolare şi identificare a germenului pe animal sau ou embrionat, metode serologice şi mai rar metode alergice.

Metode de izolare a inframicrobului

Izolarea inframicrobului psittacozei se poate face pe animale de laborator (şoarece, cobai, găină), ca şi în oul embrionat. Cele mai comode tehnici folosesc şoarecele şi oul embrionat de găină.

Înainte de a descrie aceste tehnici ţinem să subliniem numeroasele contaminări accidentale care pot surveni în decursul experimentării cu acest germene, fapt care justifică o deosebită atenţie în timpul lucrului.

Izolarea germenului pe şoarece. Pentru izolarea germenului folosim, în mod obişnuit, expectoraţii, salivă şi sînge total (recoltat pe perle de sticlă sau cu adaos de heparină). În formele mortale, inoculările se vor practica cu sînge obţinut prin puncţie cardiacă, ca şi cu suspensii de organe virulente (în special plămîni).

Produsele virulente vor trebui folosite imediat după recoltare sau, cînd inoculările se vor face abia după cîteva zile, conservate prin congelare.

Sputa şi suspensiile pulmonare întrebuinţate vor fi tratate cu amestec T.S.S. (tirotricină, streptomicină, sulfadiazină) sau numai cu streptomicină, dată fiind sensibilitatea inframicrobului la acţiunea penicilinei, dar mai ales a tetraciclinelor.

Inocularea la şoarece se poate face pe cale nazală, cerebrală, peritoneală şi intravenoasă, cele mai bune rezultate obţinîndu-se însă după inocularea intranazală şi intracerebrală. Se va prefera calea intracerebrală, dat fiind că inocularea intranazală determină cele mai multe infecţii accidentale de laborator.

După inocularea intracerebrală, şoarecii fac o meningoencefalită (hiperexcitabilitate, crize convulsive etc.) mortală la 3—10 zile de la inoculare.

De remarcat că şoarecii morţi cu psittacoză sînt găsiţi de obicei într-o poziţie caracteristică : capul în extensie, spatele curbat, labele anterioare flectate, iar cele posterioare în extensie.

După inocularea nazală, animalele fac o pneumonie mortală în 3—6 zile.

După inocularea intraperitoneală, animalele mor la 6—14 zile cu fenomene diareice, cu abdomenul dilatat etc. Uneori, animalele nu prezintă o simptomatologie tipică sau sînt aparent sănătoase şi supravieţuiesc fiind totuşi bolnave. În astfel de cazuri, şoarecii trebuie reinfectaţi după 30 de zile cu o tulpină virulentă cunoscută, fapt care va permite stabilirea diagnosticului (animalele cu infecţie inaparentă consecutivă primei inoculări vor rezista inoculării de control).

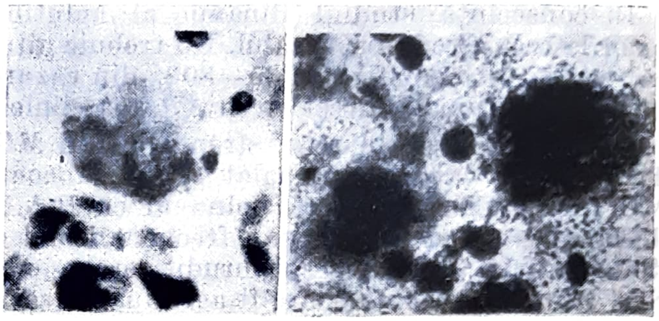


Fig. 529. — Corpusculi ornitozici intra- şi extracelulari pe amprente de plămîni de şoarece infectat experimental (coloraţie Giemsa-tanin-oranj).

La moartea animalelor se vor face, în afară de prelevări pentru inoculări sau probe imunologice, impresiuni pe lame de sticlă pentru examen microscopic, cu fragmente de meninge (după inocularea cerebrală) sau cu fragmente de ficat, splină sau exsudat peritoneal (după inoculare peritoneală), precum şi cu fragmente de plămîn (după inoculare intranazală).

Într-adevăr, pe amprentele realizate cu fragmente de organe, coloraţiile Castaneda, Macchiavello sau Giemsa vor pune în evidenţă corpusculi psittacozici de aspect polimorf, cociformi şi cocobacilari, cu diametrul cuprins între 200 şi 400 milimicroni, atît în celule (epiteliale şi macrofage), cît şi în afara celulelor, izolaţi în diplo- sau lanţuri sau grupaţi în grămezi compacte (fig. 529).

Izolarea în oul embrionat. Se folosesc ouă embrionate după 5 zile de incubare la 39°. Inocularea se practică în cavitatea vitelină, după care ouăle se menţin la 37°. Zilnic se urmăreşte la ovoscop mişcarea embrionilor. Embrionii a căror mişcare încetinită trădează suferința vor fi sacrificați. În mod obișnuit, după inocularea germenilor P.A.M., embrionii mor la 4—7 zile de la infectare.

Se prelevă sacul vitelin, se spală în ser fiziologic și apoi cu fragmente de membrană, recoltate din zona cea mai viloasă, se fac impresii pe lame și se continuă pasajele pe ou sau animal.

Trebuie subliniat că acest inframicrob, ca de altfel și alte pararickettsii, eliberează un principiu toxic, care inoculat pe cale venoasă sau peritoneală la șoarece, determină moartea acestui animal după 4—24 de ore.

La examenul microscopic atît al impresiilor de membrană (partea internă), cît și al secțiunilor de membrană vitelină, se pot observa în afară de corpusculi elementari și formațiuni de tipul incluziilor, situate în special în celulele endoteliale care căptușesc sacul gălbenușului.

Inframicrobul izolat pe animal sau ou va putea fi studiat și identificat prin metode virusoscopice, prin transmiterea la animale sau embrioni de găină și în special prin metode serologice.

Metode serologice

Folosirea reacțiilor serologice permite pe de o parte identificarea germenului izolat, iar pe de altă parte diagnosticul propriu-zis. În mod curent se întrebuințează reacția de fixare a complementului, reacția de neutralizare și aglutinarea corpusculilor inframicrobieni, în special microaglutinarea pe lamă. În ultima vreme se pun speranțe în reacția de hemaglutinoinhibare, care permite decelarea atît a anticorpilor compleți cît și a celor incompleți.

Reacția de fixare a complementului. Produsele necesare pentru identificarea unui produs patogen:

— produsul patogen (antigenul) de identificat;
— antigen standard;
— antigen normal;
— ser imun standard;
— ser normal;
— alexină, sistem hemolitic, lichid diluant.

Antigenul de identificat poate fi constituit din suspensii de organe virulente de la animalele infectate experimental (creier, ficat, splină, plămîni) sau din membrane viteline de la embrionii inoculați cu 3—4 zile în urmă.

Cu trituratul de produse virulente se face o diluție 1/10 în ser fiziologic, după care se fonolează 0,5%. Suspensia se trece în flacoane cu perle de sticlă și se introduce pentru 24 de ore la termostat la 37° și apoi 3 săptămîni la 4°, agitînd cu grijă de cîteva ori pe zi.

După acest timp, flacoanele se trec într-o baie de apă, unde se lasă 30 de minute la temperatura de fierbere a apei, procedeu care permite creșterea apreciabilă a puterii antigenului (Nigg și Bowser).

După acest timp, antigenul se centrifughează 30 de minute la 5 000 turații/min., folosindu-se apoi numai stratul mediu, debarasat atît de sedimentul de resturi celulare, cît și de stratul lipidic superficial.

Materialul obținut constituie un bun antigen, cu condiția de a nu se dovedi anticomplementar la diluția de 1/20 și de a nu da reacții pozitive cu serurile B.W. pozitive.

Antigenul standard se prepară, după tehnica descrisă, din produse virulente obținute pe ouă sau animale inoculate cu o tulpină cunoscută, adaptată și întreținută pe organismul respectiv (șoarece, embrion de găină). Prin liofilizare, calitățile antigenului cresc vizibil prin eliminarea activității anticomplementare, cît și prin creșterea specificității de tip.

Antigenul normal se prepară după același procedeu și din aceleași produse ca antigenul psittacozic, provenite însă de la animale sau ouă embrionate, normale, neinfectate.

Serul imun standard se obține fie de la convalescenți de psittacoză, fie de la animale imunizate special în laboratoare.

Serurile cele mai active se obțin pe iepuri sau cobai prin inoculări repetate (5—6), pe cale intraperitoneală, la 7 zile interval.

Serurile de convalescent, ca și cele preparate pe animale, vor fi inactivate 30 de minute la 56° și conservate la ghețar sau liofilizate.

Serul normal se obține de la aceeași specie animală pe care s-a preparat serul standard, bineînțeles de la animale neinfectate.

Alexina ca și *sistemul hemolitic* vor fi pregătite după tehnicile obișnuite.

Lichidul diluant recomandat în reacția de fixare a complementului este soluția NaCl 9‰ sau tamponul veronal.

Tehnica reacției este de asemenea cea obișnuită, putînd fi executată în tuburi sau pe plăci.

Rezultatele reacției, apreciate bineînțeles în raport cu martorii, permit un bun diagnostic al afecțiunii, în realitate un diagnostic de grup (*Pararickettsia*).

Pentru identificarea tipului inframicrobului în cadrul grupului, se va efectua reacția de seroneutralizare.

Coroborînd însă rezultatele obținute prin reacția de fixare a complementului cu simptomatologia clinică, această reacție ne furnizează date suficiente pentru identificarea germenului izolat și deci pentru diagnosticul afecțiunii.

Folosirea reacției pentru diagnosticul propriu-zis.

Produse necesare :

— serul de diagnosticat ;
— antigen standard ;
— antigen normal ;
— ser imun standard ;
— ser normal ;
— alexină, sistem hemolitic, lichid diluant.

Serul de diagnosticat va fi prelevat de la bolnavi începînd din a 10-a – a 14-a zi de boală, perioadă în care reacția devine pozitivă ; dat fiind că titrul anticorpilor crește în următoarele 20 de zile, iar după o perioadă de timp începe să scadă, este util a se recolta o a doua, eventual o a treia probă de ser, la 15 zile interval.

Antigenul standard, *antigenul normal*, *serul imun*, *serul normal*, precum și ceilalți reageni se vor prepara după tehnicile obișnuite.

Tehnica reacției : se va executa de asemenea după indicațiile obișnuite, pe plăci sau în tuburi.

Rezultate. Reacția ajută la precizarea diagnosticului bolii prin evidențierea anticorpilor fixatori de complement, începînd din a 10-a— a 14-a zi de boală. Se consideră reacții pozitive numai cele cu un titru superior lui 1/10.

Pentru diagnostic se recomandă utilizarea studiului dinamic al anticorpilor ; diferențele de titru obținute precizează diagnosticul.

Dat fiind că datorită comunității antigenice, prin R.F.C. se obține un diagnostic de grup, în cazuri dubioase se recomandă efectuarea unei reacții de seroneutralizare. În cazurile dubioase, reacția va trebui completată, de asemenea, cu o reacție Bordet-Wassermann pentru sifilis, dată fiind posibilitatea de a obține uneori rezultate pozitive în prezența antigenelor psittacozice cu serurile sifiliticilor.

Reacția de seroneutralizare este întrebuințată în special pentru identificarea tipului de germene inframicrobian izolat.

Ca și în alte pararickettsioze (limfogranulomatoza), pozitivitatea reacției poate fi apreciată fie prin neutralizarea calităților patogene ale inframicrobului caracteristic, fie prin anihilarea principiului toxic.

Se știe că în sacul vitelin al embrionilor infectați cu pararickettsii se poate evidenția o toxină care produce cu regularitate moartea șoarecelui la 4—24 de ore de la inocularea intravenoasă sau intraperitoneală. Această toxină poate fi specific neutralizată de serul preparat pe animalul de laborator, mai greu de unele seruri de convalescent.

Produse necesare :

— produsul patogen de identificat ;
— tulpină de virus standard ;
— ser imun, standard ;
— ser sigur negativ (lipsit de anticorpi antiornitozici).

Produsul patogen de identificat poate fi constituit din expectorațiile sau sîngele bolnavului, din suspensia plămînilor recoltați la necropsie, dar mai ales din materiale recoltate de la animalele sau ouăle infectate experimental (creier, plămîn de șoarece, membrană vitelină).

Produsele virulente vor fi folosite ca atare (sînge) sau diluate 1/10 în ser fiziologic. Dacă nu pot fi utilizate imediat, vor fi conservate la congelator sau liofilizate.

Tulpina de virus standard. Se va folosi fie o tulpină adaptată la șoarece pe cale cerebrală, fie de preferință o tulpină întreținută pe embrionul de găină. Tulpina va fi folosită numai după titrare prealabilă.

Serul imun se obține de preferință pe cocoși sub un an.

Păsările sînt inoculate intraperitoneal cu o tulpină cunoscută, diluată 1/5 în ser fiziologic și tratată cu fenol 0,5%, în scopul inactivării.

Injecțiile se fac de 3 ori pe săptămînă cu cîte 3 ml suspensie fenolată. După 6—8 astfel de injecții, pasărea este sîngerată, iar serul obținut posedă de obicei un titru seroneutralizant suficient pentru o bună reacție. Se va lucra cu un ser prealabil titrat.

Serul negativ, de asemenea, verificat, va proveni de la aceeași specie animală pe care s-a preparat serul standard.

Atît serul imun, cît și cel negativ vor fi folosite în reacție după inactivare timp de 30 de minute la 56°.

Tehnica reacției. Reacția de neutralizare a puterii patogene a inframicrobului ornitozic se execută după tehnica obișnuită, pe șoarece sau ou embrionat.

În cazul experimentării pe șoarece se va prefera inocularea pe cale cerebrală sau pulmonară; în cazul practicării reacției pe oul embrionat, inocularea se va face pe cale vitelină.

În tehnica de neutralizare a factorului toxic psittacozic, experimentarea se execută numai pe șoarece. Inocularea amestecului se va face, de preferat, pe cale intravenoasă sau pe cale intraperitoneală.

În reacție se va folosi un martor cu antigen standard, un altul cu antigen normal și, în sfîrșit, un martor cu ser negativ.

Rezultate. Spre deosebire de reacția de fixare a complementului care este o reacție de grup, reacția de seroneutralizare (a puterii patogene sau principiului toxic) furnizează un diagnostic de tip.

Pentru diagnosticul serologic propriu-zis, această probă nu este recomandabilă, dată fiind cantitatea extrem de mică de anticorpi neutralizanți care apar în serul bolnavilor și convalescenților de psittacoză.

Reacția de aglutinare a corpusculilor elementari. Bazîndu-se pe principiul reacției de aglutinare a corpusculilor elementari purificați, Lazarus și Meyer au aplicat în psittacoză acest test serologic.

Folosind corpusculii elementari purificați cu ajutorul centrifugării fracționate (nefiind însă necesare mai mult de 6 000 turații/min.), autorii au stabilit specificitatea reacției, fie că au lucrat cu germenii recent izolați și cu un ser imun preparat de găină, fie cu o tulpină cunoscută, întreținută în laborator, și serul bolnavului de diagnosticat. În acest din urmă caz, titrurile pozitive obținute sînt mult mai mici.

Reacția se execută în tuburi sau pe lamă, după tehnicile obișnuite, cu diluții crescînde de ser (1/4, 1/8 . . . 1/256) și suspensie de germeni purificați, formolată 0,1%. În cazul reacției în tuburi, acestea, după agitare, se introduc peste noapte în baia de apă, la 37°.

Rezultatele se apreciază cu ajutorul unei lupe, comparativ cu martorii (antigen normal, ser normal, ser hiperimun). Testul este specific, rezultatele obținute fiind, în general, concordante cu cele furnizate de celelalte reacții serologice.

În ultima vreme cercetătorii au obținut bune rezultate folosind microreacția de aglutinare pe lamă. Titrul de pozitivitate al reacției este apreciat la 1/20 sau mai mare.

Concluzii

Pentru diagnosticul ornitozei, în faza acută a bolii, se va încerca izolarea inframicrobului pe șoarece sau pe oul embrionat (calea vitelină).

Inframicrobul izolat va putea fi identificat prin metode experimentale, microscopice și în special serologice (reacția de fixare a complementului și cea de seroneutralizare).

Începînd din a 10-a—a14-a zi de boală, diagnosticul se va completa cu reacția de fixare a complementului, reacție care permite un diagnostic de grup. Pentru diagnosticul tipului inframicrobian, în cadrul grupului se va folosi reacția de seroneutralizare a puterii patogene sau a factorului toxic.

În faza tardivă și în convalescență, se vor folosi reacția de fixare a complementului cu antigene standard și microreacția de aglutinare a corpusculilor elementari.

DIAGNOSTICUL TIFOSULUI PULMONAR (febra „Q")

Pentru diagnosticul de laborator al febrei „Q" (tifosul pulmonar), contribuția laboratorului de inframicrobiologie este esențială. Aceasta deoarece febra „Q", în faza de debut, înainte de apariția fenomenelor pulmonare, poate fi confundată cu numeroase alte boli infecțioase (gripă, meningită, hepatită epidemică, febră tifoidă, tifos exantematic etc.), iar în perioada de stare, cu diferite afecțiuni ale aparatului respirator (pneumonie bacteriană, P.A.P., ornitoză etc.). Intervenția inframicrobului caracteristic, *Rickettsia burneti*, și în apariția unor afecțiuni cardiovasculare (P. Giroud, Șt. S. Nicolau, C. Surdan etc.), a unor malformații congenitale (M. Cajal, C. Surdan etc.), subliniază și mai mult importanța acestui diagnostic.

Diagnosticul se stabilește prin izolarea inframicrobului *Rickettsia burneti* ori prin depistarea apariției și creșterii anticorpilor serici, în special a celor fixatori de complement și a celor aglutinanți.

Izolarea inframicrobului

Izolarea germenului caracteristic se poate face pe animale de laborator sensibile, ca și pe oul de găină embrionat.

Izolarea pe animale sensibile. Deși s-au descris mai multe specii animale sensibile la

Rickettsia burneti (cobai, maimuță, șoarece alb, spermofil), animalul de elecție pentru izolarea inframicrobului este *cobaiul*, specie ce răspunde constant la infecția experimentală printr-o boală febrilă.

Ca produse patogene se folosesc sputa, urina, lichidul cefalorahidian și în special sîngele bolnavului, recoltate în faza febrilă, de preferință în perioada de debut.

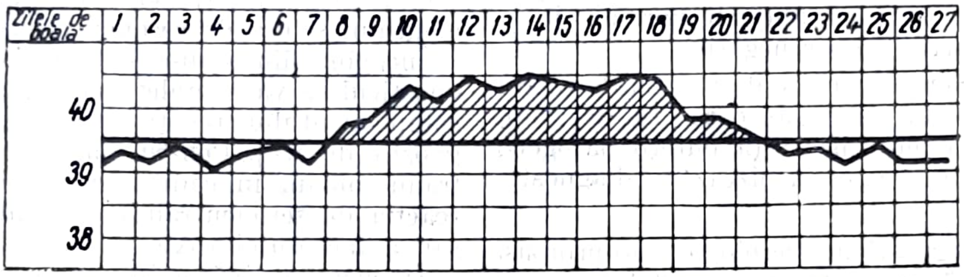


Fig. 530. — Curba febrei la un cobai infectat pe cale peritoneală cu *Rickettsia burneti*.

Inocularea cobaiului se face pe cale peritoneală (4—5 ml sînge venos injectat cît mai repede după recoltare), deși și alte căi de inoculare s-au dovedit sensibile (calea intranazală, digestivă, conjunctivală, cutanată).

Inocularea se face la animale cărora în prealabil li s-a controlat temperatura timp de 5—7 zile.

După inoculare, animalele trebuie termometrizate de două ori pe zi.

După o incubație de 4—14 zile (medie 9—10 zile), animalul face o puternică reacție termică care durează 6—10 zile (fig. 530), după care, în mod obișnuit, se vindecă [1].

Sacrificarea animalului în plină perioadă febrilă permite punerea în evidență a prezenței virusului și a identificării lui prin treceri în serie, prin examene virusoscopice și serologice.

Pentru trecerea în continuare a rickettsiei se recoltează de la animalul sacrificat, în plină febră, splina, care apare mult mărită. Trituratul de splină se inoculează pe cale peritoneală la alți cobai. Aceștia fac boala febrilă după o incubație mult mai scurtă ca în cazul primei izolări (4—5 zile).

Din punctul de vedere al modificărilor histopatologice, trebuie menționată existența unor leziuni moderate, caracterizate prin congestii, noduli și manșoane perivasculare, constituite exclusiv din celule mononucleare. Leziunile cele mai intense se întîlnesc în splină, ficat și plămîni.

Animalele care au trecut prin boală sînt rezistente la o nouă inoculare și în mare majoritate rămîn purtătoare de germeni timp îndelungat, fapt care recomandă măsuri speciale în experimentare (sacrificarea cobailor), în vederea prevenirii unor infecții accidentale în laboratoare.

Din splina cobailor infectați experimental se pot prepara bune antigene pentru reacția de fixare a complementului sau cea de aglutinare și microaglutinare, fapt care permite identificarea în cele mai bune condiții a germenului izolat.

Examenul virusoscopic pentru identificarea germenului izolat se face pe frotiuri de exsudat peritoneal, dar în special pe amprente de splină. Frotiurile colorate cu metoda Romanowski-Giemsa, Macchiavello etc. pun în evidență rickettsii de structură polimorfă (lanceolate, bacilare, bipolare etc.) și cu dimensiuni variate de la limita vizibilității la 1,5—2 μ, colorate în purpuriu cu Giemsa și în roșu cu Macchiavello.

Există cazuri în care prezența rickettsiilor nu poate fi pusă în evidență decît după 1—2 treceri pe animal.

Izolarea în oul embrionat. Datorită sensibilității embrionilor de găină față de *Rickettsia burneti*, metoda inoculărilor în oul embrionat a devenit un procedeu uzual pentru izolarea și prepararea antigenelor specifice.

Se folosesc embrioni în vîrstă de 5—6 zile, iar inocularea se practică cel mai sigur în cavitatea vitelină, deși și calea corioalantoidiană dă rezultate pozitive. După inoculare, ouăle embrionate se mențin la temperatura de 35°, timp de 5—6 zile, termen în care cei mai mulţi embrioni mor.

---

[1] Există și tulpini (Dyer, Henzerling) care provoacă constant moartea cobailor.

Membrana vitelină permite prepararea atît de frotiuri, pentru examenul virusoscopic, cît şi de antigene, pentru reacţiile serologice.

Metode serologice

Dintre reacţiile serologice folosite în diagnosticul de laborator al tifosului pulmonar, cele mai bune rezultate se obţin prin reacţia de fixare a complementului şi reacţia de aglutinare a corpusculilor rickettsieni [1].

Reacţia de fixare a complementului este utilă diagnosticului începînd din al doilea septenar de boală, cînd anticorpii fixatori sînt prezenţi în serul majorităţii bolnavilor; ei ating un titru maxim către sfîrşitul celui de-al treilea septenar.

Ca şi în alte inframicrobioze, reacţia poate fi folosită nu numai pentru diagnosticul serologic propriu-zis, ci şi pentru identificarea unui inframicrob izolat pe cobai sau embrionul de găină.

Pentru diagnosticul serologic propriu-zis sînt necesare următoarele produse:
— serul de diagnosticat;
— ser imun standard;
— antigen standard;
— antigen normal;
— alexină, sistem hemolitic, lichid diluant.

Antigenul standard se obţine (după indicaţiile date) din splina cobailor, dar în special din membranele viteline ale embrionilor de găină infectaţi experimental.

Antigenul normal se prepară întocmai ca antigenul standard, însă din ţesuturi provenite de la cobai sau embrioni normali, neinfectaţi.

Serul de diagnosticat va fi recoltat după indicaţiile obişnuite de preferinţă la începutul afecţiunii şi apoi la 10 zile interval, pentru studiul dinamic. Probele de ser, inactivate 30 de minute la 56°, vor fi menţinute la gheţar şi testate de preferinţă în acelaşi timp.

Serul imun se obţine de la convalescenţi (după a 21-a zi) sau de la cobaii inoculaţi experimental şi sîngeraţi la 14—21 de zile după coborîrea febrei [2].

După recoltarea sterilă, serurile vor fi inactivate 30 de minute la 56° şi apoi conservate la gheţar. Înainte de folosire, ele vor fi din nou inactivate aceeaşi perioadă şi la aceeaşi temperatură.

Alexina, sistemul hemolitic şi lichidul diluant vor fi preparate şi folosite după indicaţiile curente.

Tehnica reacţiei de fixare a complementului urmează de asemenea indicaţiile uzuale.

Rezultatele reacţiei permit, datorită specificităţii, un bun diagnostic al afecţiunii. Titrul anticorpilor variază de la 1/10 la 1/2 560, apărînd de obicei în al doilea septenar şi prezentînd un maximum după a 21-a zi de boală.

Reacţia de fixare a complementului poate rămîne pozitivă timp îndelungat, după infecţie, la un titru mic dar semnificativ.

★

În cazul folosirii reacţiei pentru *identificarea unui germen inframicrobian izolat pe organismele sensibile*, se vor urma aceleaşi indicaţii, antigenul pregătindu-se din inframicrobul izolat. În astfel de reacţii, se va întrebuinţa ca martor şi un ser sigur negativ.

Reacţia de aglutinare a corpusculilor rickettsieni. Reacţia de aglutinare a inframicrobului *Rickettsia burneti* este o probă serologică de o înaltă specificitate, după unii autori cu o valoare egală cu reacţia de fixare a complementului.

Aglutininele apar în serul bolnavilor între a 9-a şi a 14-a zi, termen în care peste 25% din bolnavi dau reacţii pozitive; la sfîrşitul celui de-al patrulea septenar de boală, 90% din seruri aglutinează specific corpusculii rickettsieni. După boală aglutininele persistă în ser circa 6—7 luni, după care dispar sau rămîn în titruri extrem de mici (sub 1/8). Din această cauză o reacţie pozitivă la un bolnav, la titruri superioare de 1/8, reprezintă, chiar fără un studiu dinamic, un criteriu important pentru diagnostic; creşterea în timp a titrului stabileşte cu precizie diagnosticul.

Ca şi reacţia de fixare a complementului, reacţia de aglutinare se foloseşte atît pentru diagnosticul serologic propriu-zis, cît şi pentru identificarea inframicrobului izolat pe oul embrionat sau pe animale sensibile.

Reacţia de aglutinare pentru diagnosticul propriu-zis. Produse necesare:
— antigen standard;

---

[1] Reacţia Weil-Felix poate aduce indicaţii utile, prin rezultatele constant negative în această afecţiune, comparativ cu alte rickettsioze sau pararickettsioze.

[2] Nu se vor practica supraimunizări, deoarece, aşa cum a arătat D. Combiescu, prin acest procedeu există riscul unor diminuări ale titrurilor anticorpilor serici.

— antigen normal;
— serul de diagnosticat;
— ser imun standard;
— lichid diluant.

Antigenul standard se obține cel mai ușor din rickettsiile cultivate și întreținute în sacul vitelin al embrionului de găină. Suspensia de corpusculi rickettsieni mai poate fi obținută și din splina cobailor sau șoarecilor infectați experimental, dar cultivarea vitelină este recomandabilă.

Prepararea antigenului se face după una din tehnicile obișnuite. După preparare, antigenele se formolează 0,2% sau se fenolează 0,4%.

Antigenul normal se obține din sacul vitelin sau din splina cobailor normali neinfectați, supuse acelorași manopere ca materialul patogen utilizat la prepararea antigenului standard.

Serul de diagnosticat se recoltează de la bolnavi, de preferință la interval de 10 zile. După recoltare și decantare, serurile vor fi inactivate 30 de minute la 56° și apoi conservate la gheţar, pînă la utilizare.

Serul aglutinant standard se obține de la convalescenții de febră „Q" sau de la cobaii infectați experimental și sîngerați la 4—6 săptămîni de la debutul febril.

Tehnica reacției. Reacția poate fi executată după tehnica obișnuită sau după cea mult folosită astăzi a microreacțiilor pe lamă. Se recomandă începerea diluțiilor de ser de la 1/8, titru la limita unei interpretări pozitive.

Rezultate. Reacția devine pozitivă între a 9-a și a 14-a zi de la debut. Rezultatele pozitive au o înaltă specificitate, neexistînd reacții încrucișate cu alte rickettsioze.

Reacția de aglutinare pentru identificarea unui inframicrob izolat. *Produse necesare*:
— antigenul de identificat;
— antigen standard;
— ser imun standard;
— ser negativ (lipsit de anticorpi);
— lichid diluant.

Antigenul de identificat se pregătește din materialul virulent recoltat din ouăle embrionate sau de la animalul sensibil, infectate cu germenul izolat după tehnica obișnuită.

Prepararea celorlalți reageni, ca și tehnica reacției urmează de asemenea indicațiile obișnuite.

Rezultate. Aglutinarea corpusculilor rickettsieni izolați sub acțiunea serului standard și lipsa aglutinării lor de către serul negativ autentifică diagnosticul.

Concluzii

Diagnosticul de laborator al tifosului pulmonar se bazează în perioada de debut pe izolarea inframicrobului, *Rickettsia burneti*, din sîngele, expectorațiile și mai rar din urina sau lichidul cefalorahidian al bolnavilor, pe cobai, la care produce o boală febrilă sau pe oul embrionat, după inoculare intravitelină.

Germenul izolat poate fi identificat mai ales prin reacții serologice (în special reacția de aglutinare a rickettsiilor).

În perioada de stare, în afara izolării germenului, de un real folos sînt reacția de fixare a complementului și cea de aglutinare a corpusculilor rickettsieni, reacții de o înaltă specificitate.

Concluzii generale

Diagnosticul de laborator al unei inframicrobioze respiratorii se stabilește în mod obișnuit prin izolarea și identificarea germenului cauzal și prin metode serologice.

Ca material patogen se vor recolta secreții nazofaringiene, sînge și pentru eventualitatea unei etiologii *Coxsackie* sau E.C.H.O. și materii fecale.

În cazul unei simptomatologii care traduce o infecție a căilor aeriene superioare cu germeni gripali, din grupul adenovirusurilor, al virusurilor hemadsorbante sau R.E.O., se vor face inoculări în oul de găină embrionat (calea amniotică) și în culturi celulare (HeLa, KB, embrion uman). Totodată lichidul de spălătură nazofaringiană va fi folosit și ca antigen în reacția de hemaglutinare.

Originea gripală a afecțiunii va putea fi dovedită cu ajutorul probei de hemaglutinare, practicată cu lichidul amniotic al embrionului inoculat. O reacție pozitivă va fi controlată cu testul inhibării hemaglutinării cu seruri imune de tip.

Originea adenovirotică a îmbolnăvirii va fi stabilită prin apariția efectului citopatic, caracteristic, în culturile de celule infectate. Agentul citopatogen astfel izolat va fi identificat cu ajutorul reacției de fixare a complementului (caracter de grup) și reacției de seroneutralizare (specificitate de tip).

Virusurile hemadsorbante vor fi identificate în culturi de celule prin testul de hemadsorbție.

În cazul unei simptomatologii care traduce o prindere pulmonară, inoculările se vor practica pe cale intravitelină în oul embrionat (pentru ornitoză, febră Q), în cavitatea amniotică (pentru gripă), în culturi de celule (adenovirusuri, R.E.O.). Sîngele venos se va inocula intraperitoneal la cobai (suspiciune de febră ,,Q'').

În cazul unei prezumții de infecție cu virusuri de tip *Coxsackie*, R.E.O. sau E.C.H.O. se vor face inoculări cu suspensii de materii fecale la șoareci pui și în culturi celulare (embrion uman, rinichi de maimuță).

Izolarea unui germen pararickettsian sau rickettsian în sacul vitelin va fi dovedită prin colorații adecvate ale amprentelor de membrană vitelină. Germenul astfel descoperit va fi identificat prin reacții serologice (R.F.C., seroneutralizare, aglutinare). Etiologia gripală va fi stabilită prin testul HA, efectuat cu lichidul amniotic, iar originea adenovirotică, R.E.O. sau E.C.H.O., prin efectul citopatic apărut în culturile celulare. Aspectul citopatic va da indicații asupra metodelor care urmează a fi folosite pentru identificarea germenului izolat (R.F.C. pentru adenovirusuri, seroneutralizare pentru R.E.O. și E.C.H.O. etc.). Boala febrilă apărută la cobaiul inoculat pe cale peritoneală va dirija diagnosticul către o infecție cu *Rickettsia burneti*. Colorația amprentelor din splină va confirma originea rickettsiană a bolii experimentale, iar aglutinarea germenului izolat sau reacția de seroneutralizare îl vor identifica. Originea *Coxsackie* a afecțiunii va fi încriminată cînd șoarecii sugari inoculați vor face boala paralitică caracteristică. Examenul microscopic al mușchilor acestor animale permite confirmarea diagnosticului prin miozita caracteristică. Tipul virusului va fi precizat cu ajutorul reacției de seroneutralizare.

Diagnosticul serologic al afecțiunii va fi stabilit mai ales prin studiul dinamic al anticorpilor serici.

Reacția de hemaglutinoinhibare (RHAI) este recomandată în gripă și după cercetări recente și în ornitoză; reacția de fixare a complementului, în adenoviroze, gripă, ornitoză, febra ,,Q''.

Pentru precizarea diagnosticului unei pneumonii atipice (germene PAP) se va folosi reacția de aglutinare la rece, aglutinarea streptococului MG și eventual izolarea germenului în medii de agar.

Pentru diagnosticul diferențial între gripă și guturai se va practica și examenul citologic (citorinodiagnosticul), eventual proba Panthier.

În cazurile necropsice se va încerca izolarea germenului cauzal din secreții traheale și bronșice, din mucoasa traheală și plămîn, eventual și din conținutul intestinal.

BIBLIOGRAFIE

ADERCA I. — Virusurile REO, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 128.

BALȘ M., NAFTA I., ZILIȘTEANU E., GROBNICU M. — *Microbiologie (București)*, 1961, nr. 5, p. 409.

BALȘ M., NAFTA I., ZILIȘTEANU E., NICULESCU I. GROBNICU M. — *Microbiologia (București)*, 1962, vol. 7, nr. 6, p. 541.

BRONIȚKI AL. — Grupul adenovirusurilor, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 252.

BRONIȚKI AL. — Grupul virusurilor paragripale, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 242.

BUKRINSKAYA A. G., PAKTORIS E. A. — *Acta Virol.*, 1960, vol. 4, p. 184.

CAJAL N. — Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane, Ed. Acad. R.P.R., București, 1958.

CHANOCK R. M. — *J. exp. Med.*, 1956, vol. 104, p. 555.

DEREVICI A. — Gripa. Aspecte din problemă, Ed. Acad. R.P.R., București, 1959.

CONSTANTINESCU M. N. și MARINESCU GH. — Gripa, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 208.

CONSTANTINESCU M. N. și MARINESCU GH. — Rickettsioze umane, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 701.

DREIZIN R. S. — K probleme adenovirusov, B problemî grippa i respiratorniia zabolevanii, Medghiz, Moscova, 1959.

GIROUD P. — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1946, nr. 37, p. 406.

GOLDWASSER R. A., SHEPARD C. C. — *J. Immunol.*, 1958, nr. 80, p. 122.

GORBUNOVA A. S., SOKOLOV M. I. — Rukovodstovo po laboratornoi diagnostike grip, paragripoznîh i adenovirusnîh zabolevanii, Medghiz, Moscova, 1960.

ISAIA G., PREDESCU L., BRONIȚKI AL. și RUTTER G. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1962, vol. 13, nr. 2, p. 255.

JDANOV V. M. — Epidemiologhia, Medghiz, Moscova, 1961.

JDANOV V. M., BUKRINSKAJA A. G. — *Vop. Virusol.*, 1961, nr. 6, p. 542.

MONACI V. — La settimana degli ospedali, 1961, vol. 3, nr. 3—4, p. 283.

MUȘEȚEANU C. — *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 1960, vol. 178, p. 426.

NICOLAU Șt., CAJAL N. — *Microbiologia (București)*, 1962, nr. 2, p. 97.

NICOLAU Șt., SURDAN C., SĂRĂȚEANU D., ATHANASIU P., ANAGNOSTE B., ILIESCU C., RĂDESCU R. — *Stud. cercet. Inframicrobiol.*, 1961, nr. 12, p. 275.

PETRESCU AL. — Guturaiul, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 245.

PREDESCU L. — *Stud. cercet. Inframicrobiol.*, 1961, vol. 12, p. 233.

ROWE W. P., HUEBNER J. R. — *Amer. J. Trop. med. Hyg.*, 1956, vol. 5, p. 453.

SABIN A. — *Science*, 1959, vol. 130, p. 1387.

SĂRĂȚEANU D. — Ornitoza, Ed. Acad. R.P.R., București, 1963.

SĂRĂȚEANU D. și SURDAN C. — *Microbiologia (București)*, 1962, nr. 2, p. 119.

SMORODINȚEV A. A., SELIVANOV A. A. — *Vop. Virusol.*, 1959, vol. 6, p. 648.

SMORODINȚEV A. A. jr. — *Acta Virol.*, 1962, vol. 6, nr. 4, p. 338.

DIAGNOSTICUL UNOR MENINGITE CU LICHID CLAR DE NATURĂ INFRAMICROBIANĂ

Ca și în alte afecțiuni în care datorită unei simptomatologii comune examenul clinic trebuie obligatoriu completat de investigațiile laboratorului de specialitate, în sindromul meningian acut însoțit de un lichid cefalorahidian clar cu o limfocitoză mai mult sau mai puțin marcată, laboratorul de virusologie poate și trebuie să stabilească cu precizie diagnosticul etiologic. Astăzi, diagnosticul de „meningită virotică'' sau „meningită cu lichid clar'' sau „meningită aseptică'' nu mai trebuie acceptat; colaborarea dintre clinician, epidemiolog și virusolog poate preciza într-un termen variabil (din păcate încă destul de lung) etiologia certă, cu tot numărul mare de inframicrobi ce s-au dovedit capabili de a determina un astfel de sindrom.

Într-adevăr, eliminînd cazurile ce pretează la confuzie, ca meningitele de origine microbiană (meningită bacilară, leptospiriană, bruceloasă etc.), de origine toxi-alergică sau chiar prin agenți fizici (cum este cea datorită insolației), un sindrom meningian însoțit de un lichid clar, limfocitar poate fi produs de un număr mare de inframicrobi și mai ales de virusurile:

— coriomeningitice limfocitare;
— urlian;
— poliomielitice;
— *Coxsackie*;
— E.C.H.O.;
— encefalitice;
— herpetic etc.

Sindromul meningian produs de aceste virusuri poate reprezenta fie o meningită idiopatică, fie o modificare meningiană caracterizînd faza de debut a unei nevraxite (encefalită, rabie etc.), fie o stare meningiană ce traduce atingerea nevraxică de către un virus cu localizare obișnuită, alta decît sistemul nervos.

La această ultimă situație pot participa, alături de virusurile semnalate, încă alți mulți inframicrobi (virusul varicelos, zonatos, gripal, rujeolos, virusul mononucleozei infecțioase etc.).

Indiferent de virusul cauzal, diagnosticul trebuie și poate fi stabilit cu precizie.

De la început trebuie însă subliniat că laboratorul singur, izolat, nu poate stabili diagnosticul fără informațiile clinicianului și chiar ale epidemiologului, informații de cea mai mare utilitate.

Astfel, semnalarea existenței unui exantem ce însoțește meningita dă indicații utile pentru investigări în direcția grupului E.C.H.O., durerile musculare sugerează un diagnostic de infecție cu virusuri *Coxsackie* etc.; existența de rozătoare în imobilul locuit de bolnav va pune în discuție, în primul rînd, coriomeningita limfocitară; contactul bolnavului cu cabaline cu fenomene nervoase sau habitatul în regiuni invadate de țînțari sau căpușe va sugera un diagnostic de encefalită etc.

Bazat pe aceste informații, virusologul care folosește pentru diagnosticul etiologic al unei meningite cu lichid clar *metode de izolare și identificare a agentului cauzal*, *metode serologice* și mai rar *metode alergice și morfopatologice* va putea să-și dirijeze cercetările cît mai judicios.

Dar după cum s-a mai semnalat și în alte capitole, orientarea diagnosticului începe încă din faza de recoltare a materialului patogen util izolării virusului.

Dată fiind predominanța unora sau altora dintre inframicrobi în etiologia „meningitelor cu lichid clar'', se recomandă recoltarea în primul rînd a *materiilor fecale* (pentru virusuri E.C.H.O., *Coxsackie*, poliomielitice) și a *sîngelui* (virusuri urliene, coriomeningitice, encefalitice) și în al doilea rînd a *lichidului cefalorahidian* (herpes, coriomeningită limfocitară, E.C.H.O.) etc.

În acest capitol ne vom ocupa exclusiv de meningitele virotice primare și în special, de cele produse de virusuri ce nu formează obiectul altor capitole (poliomielită, E.C.H.O., *Coxsackie*) și pentru care diagnosticul urmează același plan ca pentru afecțiunea respectivă în forma ei clinică clasică; ne vom ocupa deci de *coriomeningita limfocitară, de meningita urliană, de cea encefalitică și de cea herpetică.*

Înainte însă de a indica metodele de diagnostic pentru fiecare din aceste entități nosologice, considerăm utile cîteva date privind aspectul comun al lichidului cefalorahidian, element ce furnizează primele indicații utile diagnosticului de prezumție.

Lichidul cefalorahidian obţinut sub o presiune normală sau cel mai des uşor crescută este clar, uneori opalescent sau xantocromic. Lăsat în repaus nu formează văl; există totuşi cazuri excepţionale în care se poate constata şi prezenţa unui coagul fibrinos.

Citorahia arată cel mai des o pleiocitoză marcată (1 000—3 500 elemente/ml) ce evoluează progresiv în cursul bolii şi care revine la normal abia după cîteva săptămîni de la vindecarea clinică. Există, rareori, cazuri cu un număr mic de elemente (10—20), cazuri care pretează cel mai des la confuzii.

În ce priveşte formula citologică, aceasta este dominată de limfocite; s-au semnalat cu totul excepţional cazuri cu prezenţă de polinucleare neutrofile.

În ce priveşte analiza biochimică a lichidului cefalorahidian se semnalează: albuminorahie variabilă ($0,30-2g^0/_{00}$), o glicorahie şi clorurorahie normale sau uşor scăzute. Reacţiile Pandi, Nonne-Appelt, benzoe şi aur coloidal sînt de cele mai multe ori pozitive.

DIAGNOSTICUL CORIOMENINGITEI LIMFOCITARE

Cunoscută şi sub numele de boala Armstrong, meningita limfocitară benignă, această afecţiune este clinic cu totul asemănătoare şi în consecinţă des confundată cu alte meningite limfocitare benigne virotice.

Virusologul are însă la îndemînă metode ce-i permit stabilirea cu certitudine a diagnosticului acestei afecţiuni şi a depistării chiar a sursei de infecţie, prin izolarea virusului de la şoareci, purtători în mare procent ai agentului specific.

Diagnosticul de laborator se bazează pe *izolarea virusului pe animale sensibile* şi *pe metode serologice.*

IZOLAREA VIRUSULUI PE ANIMALE SENSIBILE

Izolarea virusului coriomeningitei limfocitare benigne se realizează curent pe şoarecele adult, ce face o boală caracteristică; unele tulpini de virus sînt patogene şi pentru cobai. În practică, experimentaţia se face pe şoarecele adult[1].

Ca produse patogene se vor folosi *sîngele* şi *lichidul cefalorahidian.*

Sîngele va fi recoltat pe perle de sticlă sau cu heparină (se va avea grijă ca, o dată cu recoltarea sîngelui total pentru izolare, să se recolteze şi sînge pentru examene serologice).

Şoarecii vor trebui să provină din loturi verificate ca indemne de coriomeningită limfocitară.

În acest scop în laboratoare vor exista întotdeauna, izolaţi pentru experimentaţia cu virus coriomeningitic, o serie de şoareci ce în prealabil au fost injectaţi pe cale cerebrală cu bulion steril. Prin acest procedeu, şoarecii purtători de virus fac o boală mortală cu simptomatologie tipică la 3—15 zile de la injectarea cerebrală.

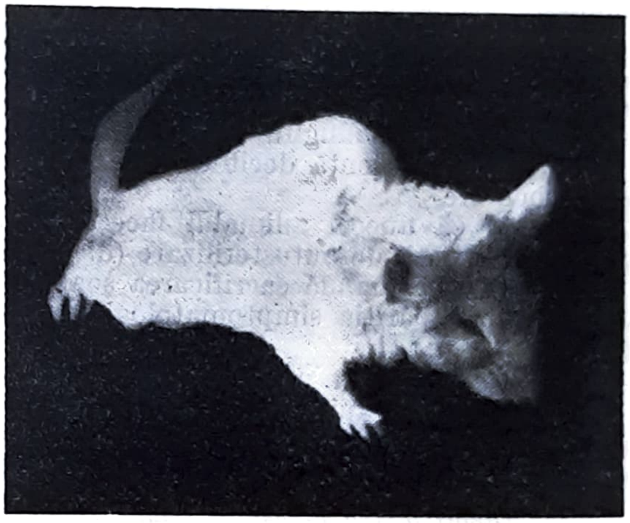


Fig. 531. — Şoarece bolnav cu coriomeningită limfocitară la 5 zile după inocularea intracerebrală.

Calea de inoculare recomandabilă este cea *cerebrală*, deşi şi *calea peritoneală* s-a dovedit a fi foarte eficace.

Inocularea cerebrală se practică pe 3—5 şoareci, după tehnica obişnuită.

Animalele inoculate vor fi ţinute izolat în borcane şi observate zilnic cu atenţie; separat vor fi observate un număr egal de animale, din acelaşi lot, injectate intracerebral numai cu lichid diluant (aceasta mai ales cînd nu s-a lucrat pe un lot de animale pregătite după indicaţiile de mai sus).

La 4—5 zile de la inoculare, uneori mai tîrziu, animalele stau ghemuite, lipsite de vioiciune, cu părul zbîrlit şi ochii pe jumătate închişi (fig. 531). Animalul ţinut de coadă, suspendat, va prezenta o serie de mişcări convulsive, rapide, ale membrelor, ceea ce va fi perceput cu degetele experimentatorului ca un tremur caracteristic. Lăsînd animalul din mînă, el face, de multe ori, spontan, crize tonicoclonice, cu membrele posterioare în extensie forțată. Crizele convulsive pot surveni și spontan; deseori moartea animalului se produce după o astfel de criză, ceea ce face să fie găsit într-o poziție oarecum caracteristică: labele anterioare flectate, spatele foarte îndoit, membrele posterioare în extensie.

---

[1] Şoarecii pui fac o boală inaparentă clinic.

Moartea animalului survine de obicei la 5—8—15—20 de zile, în funcție de tulpină. Din această cauză, animalele inoculate cu produse suspecte de coriomeningită limfocitară nu vor fi scoase din experiență decît după 21 de zile de la inoculare.

Dat fiind că uneori animalul face o boală nemortală urmată de autosterilizare (dispariția virusului), se recomandă sacrificarea șoarecilor imediat după apariția simptomatologiei caracteristice.

La necropsie se va preleva, pentru treceri ulterioare, creierul animalului, deși și alte organe s-au dovedit virulente (plămîn, rinichi, splină etc.).

Identificarea virusului izolat

După obținerea bolii experimentale la animal, virusul izolat va trebui identificat și în acest fel diagnosticul precizat.

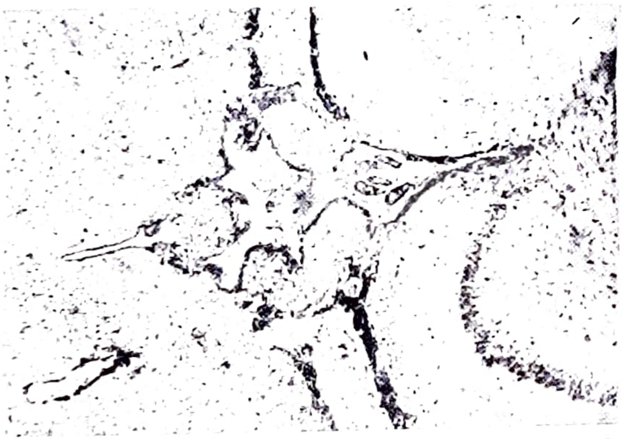


Fig. 532. — Secțiune prin creier de șoarece mort în urma infecției experimentale cu virusul coriomeningitei limfocitare. Infiltrație intensă cu limfocite în special la nivelul plexurilor coroide (colorație hematoxilină-eozină).

Identificarea virusului coriomeningitic se face în primul rînd prin *studiul leziunilor histologice obținute* la animalul de experiență și prin *metode serologice*.

Studiul leziunilor histologice se adresează creierului și plămînului.

La nivelul *creierului* se constată existența unei meningite de intensitate variabilă, tradusă printr-o infiltrație cu leucocite, în cea mai mare parte limfocite și cu rare histiocite. Un element caracteristic este dat de intensa infiltrație limfocitară de la nivelul plexurilor coroide, unde se întîlnesc nodozități impresionante burate de limfocite (fig 532). În parenchimul cerebral se întîlnește, de asemenea, o infiltrație limfocitară discretă și rare manșoane perivasculare. Cu totul excepțional au putut fi puse în evidență rare formațiuni incluzoide acidofile, situate în citoplasma unor gliocite.

La nivelul *plămînilor* se constată adesea aspecte de congestie, alveolită cu exsudat seros și o intensă infiltrație limfocitară.

Leziunile pulmonare, uneori extrem de intense, pot alteori să lipsească total.

Virusul izolat poate fi identificat și prin metode serologice și chiar printr-o metodă indirectă, care, prin simplitatea ei, merită a fi folosită.

Metoda, care aparține lui Rustigian, constă în inocularea intramusculară la șoarecele pui a 0,2 ml suspensie virulentă. La șoriceii sacrificați la 2—6 zile de la inoculare, se poate constata o adenopatie cu reacție limfoidă, iar la examenul histopatologic, edem și infiltrație puternică a țesutului conjunctivoadipos, cu limfocite, monocite și rare plasmocite; fibrele musculare prezintă constant un aspect normal.

Metode serologice

În practica uzuală, dintre metodele serologice propuse se folosesc *reacția de neutralizare* (pentru identificarea unui virus izolat) și *reacția de fixare a complementului* (pentru diagnosticul propriu-zis).

Reacția de neutralizare. *Produse necesare*:
— produsul virulent de identificat;
— antigen standard;
— ser imun standard;
— ser negativ (cunoscut ca lipsit de anticorpi).

Produsul virulent de identificat este reprezentat de emulsia de creier recoltat de la șoarecii ce au făcut boala experimentală după infectarea cu produsul de diagnosticat.

În mod obișnuit se face o suspensie 1/5 în soluție izotonică de NaCl 8,5‰ sau în lichid amniotic de pasăre, diluat. Suspensia se centrifughează 10 minute la 3 000 turații/min.; lichidul supernatant se folosește ca antigen.

Se recomandă întrebuinţarea rapidă a antigenului; în cazul cînd va fi utilizat mai tîrziu, el trebuie congelat.

Antigenul standard este preparat dintr-o tulpină de virus de colecţie, verificată, adaptată la şoarece sau cobai şi titrată în prealabil.

Dat fiind că în mod curent reacţiile de seroneutralizare se execută pe şoarece, se recomandă folosirea de tulpini întreţinute pe această specie animală.

Virusul titrat va putea fi menţinut în condiţii perfecte la congelator la — 30 pînă la — 70°, păstrîndu-şi nemodificat titrul timp de 3—4 luni.

Serul imun se obţine fie de la convalescenţi, fie de la animale de laborator pregătite special. Serul uman va fi recoltat steril la 8—10 săptămîni de la debutul bolii şi păstrat congelat în fiole de 1 ml sau liofilizat.

Serul animal se prepară pe cobai.

În caz că posedăm un virus nepatogen pentru cobai, vom inocula animalul pe cale peritoneală cu 2 ml suspensie virulentă 1/10, centrifugată, de 3 ori, la interval de 7 zile. La 30 de zile de la ultima inoculare, animalul va fi sîngerat, iar serul testat faţă de o tulpină cunoscută, congelat sau liofilizat.

În caz că tulpina folosită este patogenă şi pentru cobai, se procedează astfel:

Se recoltează splina unui cobai inoculat cu 6 zile în urmă, se triturează şi se face o diluţie 1/5 în diluant răcit. Se centrifughează 20 de minute la 3 000 turaţii/min., după care se recoltează lichidul superficial şi se fenolează 1%. Se introduce pentru 3 zile la gheţar la + 4°, după care se corectează pH-ul la 7,2 şi se injectează la cobai, pe cale peritoneală (1 ml). După o săptămînă se reinjectează 1,5 ml, doză ce se repetă de 3 ori la 7 zile interval. La 7 zile de la ultima injecţie se inoculează pe cale subcutanată 0,5 ml dintr-un amestec în părţi egale de diluţie virulentă 1/1 000 creier de cobai şi ser — cobai normal.

La 8 zile se sîngerează animalul, serul obţinut fiind utilizabil atît în reacţia de seroneutralizare cît şi în fixarea complementului.

Serul normal se obţine de la cobai sau oameni sănătoşi. De remarcat că serurile obţinute de la indivizi fără antecedente coriomeningitice trebuie verificate, fiind cunoscute şi în această viroză infecţii inaparente clinic[1].

Serurile atît cele imune, cît şi cele normale vor fi folosite în reacţie după inactivare prealabilă 30 de minute la 56°.

Tehnica reacţiei de seroneutralizare se execută pe şoarece, după indicaţiile curente, inocularea materialului, ser + virus, făcîndu-se pe cale cerebrală şi avînd grijă ca în reacţie să se introducă 2 martori şi anume: ser imun + antigen standard şi ser normal + virusul de identificat.

Contactul dintre suspensia virulentă şi serul imun se va face 5 ore, la temperatura camerei sau 4 ore, la 37°.

Animalele inoculate vor fi menţinute sub observaţie 20 de zile, cînd se apreciază definitiv rezultatele prin comparaţie cu martorii.

Se consideră o reacţie *negativă* atunci cînd numărul şoarecilor morţi, în lotul inoculat cu antigenul de diagnosticat + serul imun, este egal cu cel al şoarecilor sucombaţi în lotul cu ser normal. Se consideră o reacţie *intens pozitivă* cînd, în opoziţie cu martorii, în lotul cu ser imun au rezistat toate animalele şi *slab pozitivă*, cînd în acest lot au rezistat numai jumătate din animalele inoculate.

★

Apariţia anticorpilor specifici în serul bolnavilor fiind foarte tardivă (8—12 săptămîni de la debut), reacţia de seroneutralizare nu este folosită decît excepţional pentru diagnosticul serologic al bolii.

Reacţia de fixare a complementului. Spre deosebire de reacţia de seroneutralizare, reacţia de fixare a complementului este curent folosită pentru diagnosticul serologic propriu-zis şi mai puţin pentru identificarea unui germene izolat.

Anticorpii fixatori de complement apar în această viroză la 2—3 săptămîni de la debut şi persistă maximum un an de la vindecare; această situaţie măreşte mult valoarea diagnostică a reacţiei de fixare.

Produse necesare:

— serul de diagnosticat;
— ser negativ;
— antigen standard;
— antigen normal;
—alexină, sistem hemolitic, lichid diluant.

Serul de diagnosticat se recoltează în faza de debut a bolii, cînd în mod obişnuit este negativ şi după 2—4 săptămîni, perioadă în care în mod obişnuit anticorpii fixatori de complement sînt prezenţi.

---

[1] Aproximativ 12% din serurile indivizilor mai vîrstnici de 17 ani conţin anticorpi neutralizanţi.

În caz că nu s-a putut recolta serul la începutul bolii, se vor recolta 2—3 probe de sînge, la 10 zile interval fiecare.

Serurile sterile vor fi menţinute pînă în momentul efectuării reacţiei, congelate sau liofilizate.

Antigenul standard se prepară în mod curent din creierul şoarecilor sau, în cazul unor tulpini patogene şi pentru cobai, din creierul, plămînul şi splina cobailor, infectaţi experimental cu o tulpină verificată.

Deşi în cazul coriomeningitei limfocitare s-au identificat 2 tipuri de antigene fixatoare de complement — *antigenul solubil* (inconstant) şi *antigenul corpuscular* — în practica uzuală se utilizează acest din urmă antigen.

Pentru pregătirea antigenului *corpuscular* s-au propus numeroase tehnici mai mult sau mai puţin complicate. Dintre acestea vom descrie cea propusă de Lépine şi colab.

Se recoltează organele virulente de la animalele sacrificate în plină boală şi se triturează bine în mojare în prealabil răcite. Se face o diluţie de 1/100 la greutate, în ser fiziologic. Se filtrează prin hîrtie de filtru, iar filtratul obţinut constituie antigenul ce se conservă în bune condiţii la gheţar.

Antigenul normal se prepară, de asemenea, în aceleaşi condiţii cu antigenele virotice, din organe provenite de la animale normale neinfectate.

Lichidul diluant recomandat este soluţia NaCl 9$^0/_{00}$ sau tamponul veronal.

Alexina şi sistemul hemolitic se obţin după tehnicile uzuale.

Tehnica reacţiei de fixare a complementului este cea obişnuită, efectuîndu-se în tuburi sau pe plăci.

Serul de diagnosticat se foloseşte în diluţii crescînde, pornind de la diluţia 1/2; reacţia se execută paralel cu toate probele de ser, recoltate de la acelaşi bolnav. Pentru a anula calitatea anticomplementară a unor seruri, se recomandă ca înaintea executării reacţiei serul diluat 1/2 să fie reinactivat 20 de minute la 60°.

Rezultatele se apreciază în comparaţie cu tuburile martore.

În caz că se folosesc mai multe probe de ser, aprecierea rezultatelor este simplă, diagnosticul fiind fondat pe creşterea titrului anticorpilor fixatori în proba a 2-a şi a 3-a. Trebuie cunoscut că, în mod obişnuit, în această viroză, titrul fixator de complement este în general coborît, depăşind foarte rar 1/40. La 8 săptămîni de la debut, titrul fixator începe să scadă şi devine negativ, în general, la 12 luni de la vindecare; există şi negativări mult mai rapide, ca şi foarte rare cazuri cu reacţii pozitive persistente, la titruri scăzute şi după un an.

În cazul folosirii unei singure probe de ser, recoltată la 2—4 săptămîni de la debut, se va putea stabili diagnosticul numai pe baza unui titru 1/16 [1].

Concluzii

Diagnosticul de coriomeningită limfocitară se stabileşte pe baza izolării virusului specific din sînge (primele 2 săptămîni) sau lichid cefalorahidian (prima săptămînă), în special pe şoarece, după inocularea pe cale cerebrală. Dată fiind extinderea acestei viroze printre şoareci, este necesară o atenţie deosebită în decursul experimentării. Boala experimentală va fi diagnosticată histopatologic, iar virusul izolat va fi identificat prin reacţia de seroneutralizare.

Paralel cu izolarea virusului, se vor urmări şi modificările serologice şi în special dinamica anticorpilor fixatori de complement.

Faptul că aceşti anticorpi apar tardiv, că au o evoluţie evidentă şi că, în general, dispar la maximum 12 luni de la vindecare ridică valoarea diagnostică a acestei reacţii.

Titrul minim valabil pentru stabilirea unui diagnostic este de 1/16.

DIAGNOSTICUL MENINGITELOR PROVOCATE DE VIRUSURI ENCEFALITICE

Dat fiind că numeroase „meningite aseptice" s-au dovedit a fi determinate de virusuri aparţinînd vastului grup de virusuri encefalitice[2], considerăm util de a menţiona cîteva din metodele folosite curent pentru diagnosticul acestor infecţii, fie că este vorba de formele pur meningiene, fie de forme tipice sau atipice encefalitice.

Printre mijloacele pe care laboratorul de inframicrobiologie le are actualmente la dispoziţie pentru diagnosticul encefalitelor virotice, cele mai utile rezultate le furnizează izolarea virusului și metodele serologice (reacția de fixare a complementului, reacția de neutralizare și reacția de hemaglutinoinhibare).

---

[1] Trebuie cunoscut că uneori se obţin rezultate pozitive în prezenţa antigenelor coriomeningitice limfocitare cu seruri provenite de la sifilitici serologic pozitivi, ca şi de la bolnavi cu tumori cerebrale.

[2] Pînă în prezent s-au descris circa 20 de tipuri de virusuri encefalitice transmise prin intermediul artropodelor.

Metodele de izolare a virusului

Deși unele virusuri encefalitice au putut fi transmise la mai multe specii animale (șoarece, hamster, iepure, oaie, cal, maimuță etc.) și cu toate că unii autori preferă șoarecele tînăr ca animal de elecție, la ora actuală culturile celulare constituie gazdele ideale, recomandate pentru izolarea acestor virusuri.

Dat fiind numărul mare de infecții de laborator produse de virusuri encefalitice, se recomandă o atenție specială în timpul experimentării cu astfel se germeni inframicrobieni (lucrul în boxe, cu mască și ochelari, atenție deosebită la îngrijirea animalelor, iradiere cu R.U.V. a meselor de lucru și a boxei după experimentare etc.).

Ca *material patogen*, pentru izolarea virusului, se folosește sîngele bolnavului, care poate conține virusul pînă la 10—20 de zile de la debut [1]. După recoltare, sîngele trebuie introdus în gheţar, iar decantarea serului va trebui făcută la rece imediat după coagulare.

În cazurile letale, ca material patogen se va folosi suspensia de substanță cerebrală 1/10 în ser fiziologic tamponat la pH=7,4 sau în soluție Hauks.

Inocularea șoarecilor se va face pe *cale cerebrală*, deși cele mai multe virusuri encefalitice sînt patogene și pe alte căi (peritoneală, intranazală, subcutană).

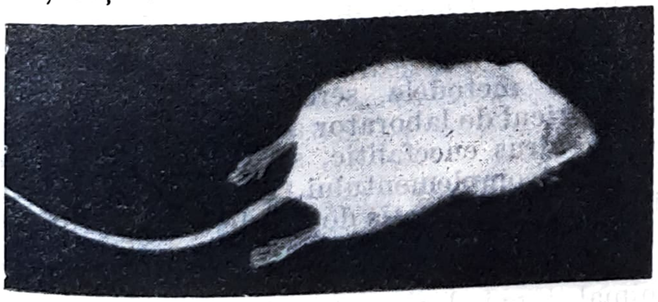


Fig. 533. — Șoarece mort la 9 zile de la inocularea intracerebrală cu virusul encefalitei slovace.

După inoculare, șoarecii fac de obicei la 6—12 zile o boală mortală.

La 48—72 de ore în cazul encefalitei americane, la 3—4 zile în cazul encefalitei japoneze, la 4—10 zile de la inoculare în cazul encefalitei slovace și ruse, animalul devine agitat, hiperestezic, prezintă tremurături și convulsii. Boala continuă cu pareze și paralizii spastice, animalul murind de obicei cu extensia trenului posterior (fig. 533).

De obicei, moartea survine la 2—4 zile de la apariția simptomelor. Uneori, pentru izolarea virusului, sînt necesare 2—3 treceri oarbe făcute cu creierul șoarecilor sacrificați la 5—6 zile de la inoculare. Pe secțiunile de creier se constată infiltrație cu polinucleare și în special, cu mononucleare la nivelul meningelui, ca și în parenchimul cerebral, unde se întîlnesc, pe lîngă manșoane, și noduli perivasculari, numeroase focare hemoragice și aspecte de degenerescență neuronală, mai mult sau mai puțin intense.

În afară de aceste modificări, se mai constată noduli de proliferare microglică, leziuni de altfel asemănătoare cu cele întîlnite în patologia umană (fig. 537).

Schoen și Drobîșevskaia au descris prezența inconstantă a unor incluzii nucleare, a căror origine și semnificație nu este încă lămurită.

Dat fiind că nici boala experimentală și nici modificările histologice nu sînt suficient de caracteristice pentru a stabili cu precizie diagnosticul (nici măcar un diagnostic de grup), orice virus izolat va trebui identificat cu ajutorul metodelor serologice.

Izolarea virusului în culturi celulare

Numeroși autori au publicat cultivabilitatea diferitelor tulpini de virusuri encefalitice în variate tipuri de celule, cu sau fără determinarea unui efect citopatic evident.

Prin persistență deosebită, specialiștii au putut găsi în cele din urmă celule foarte sensibile la acțiunea diferitelor virusuri encefalitice, cu producerea de modificări citopatice vizibile, utile diagnosticului rapid.

Celulele sensibile. Deși celulele considerate sensibile la aceste virusuri sînt numeroase, analiza rezultatelor obținute permite a se recomanda pentru izolarea acestor virusuri culturile primare de rinichi de embrion de oaie, de rinichi embrionar de porc, fibroblaștii embrionari umani, embrionul de pasăre și linia Detroit-6.

Lucrările lui Gaidamovici și colab., Dubov, Lvova, Levcovici, Semenova și ale altor autori au adus date concludente, extrem de utile, în această direcție.

---

[1] Cu toate acestea, marea majoritate a izolărilor pozitive au loc mai ales în primele 5 zile de boală.

Efectul citopatic (ECP) poate fi observat pentru unele virusuri encefalitice de la prima — a doua trecere, mai ales cînd se folosesc celule *Detroit-6* sau *celule renale embrionare de oaie*. Efectul citopatic apare la 5—7 zile de la infectare, acest timp diminuînd cu numărul trecerilor realizate. Virusurile encefalitei japoneze, West Nill, produc ECP evidente în majoritatea celulelor recomandate; virusul encefalitei de căpuşă determină un ECP în special în celulele Detroit-6, embrionul uman, inimă *Cynomolgus* (fig. 534, 535 şi 536).

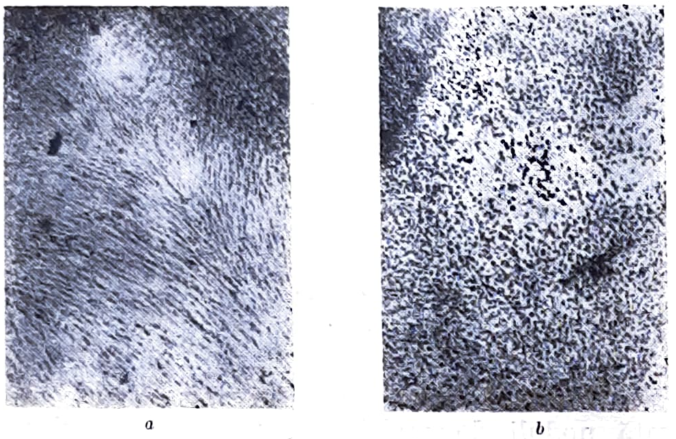


Fig. 534. — *a* — celule embrionare umane neinfectate; *b* — ECP determinat de virusul encefalitic de căpuşă, în celule embrionare umane (A. V. Dubov).

Cultivarea acestor virusuri în culturi celulare permite, alături de o izolare mai comodă şi rapidă, şi condiţii favorabile pentru reacţia de seroneutralizare efectuată atît pentru identificarea unui virus izolat, cît şi pentru un diagnostic serologic propriu-zis.

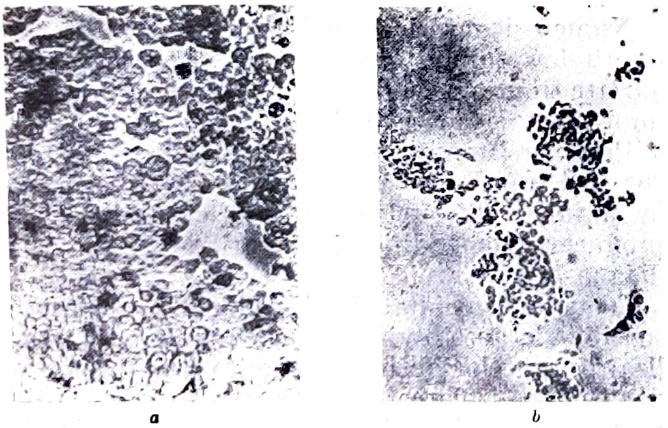


Fig. 535. — *a* — celule Detroit-6 neinfectate; *b*—ECP determinat de virusul encefalitic de căpuşă în celule Detroit-6 (A. V. Dubov).

Recent, Lvova a arătat că, prin folosirea metodei anticorpilor fluorescenţi (metoda indirectă) în culturile de celule în care s-a încercat izolarea unor virusuri encefalitice de căpuşă, se obţin rezultate excelente, atît în ce priveşte procentajul de pozitivitate, cît şi rapiditatea precizării diagnosticului.

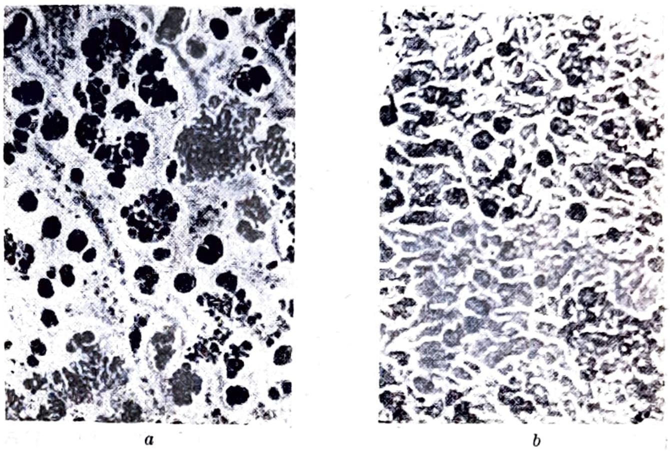


Fig. 536. — *a.* — celule cord *Cynomolgus* neinfectate; *b* — ECP determinat de virusul encefalitic de căpuşă în celule cord de *Cynomolgus* (A. V. Dubov).

Metoda permite, o dată cu diagnosticul de encefalită, şi precizarea tipului de virus encefalitic. De reţinut că rezultate pozitive au fost obţinute şi în lipsa ECP, chiar de la prima trecere. Metoda s-a dovedit valabilă şi pentru alte tipuri de virus encefalitic (encefalită japoneză, West Nill, etc.).

Metode serologice

Dintre metodele serologice cunoscute, în diagnosticul de laborator al unei infecţii produse de un virus encefalitic, se folosesc reacţia de fixare a complementului, reacţia de hemaglutinoinhibare şi reacţia de seroneutralizare; prima din aceste reacţii este mai frecvent întrebuinţată pentru identificarea unui virus izolat pe animal şi mai ales, pentru diagnosticul serologic propriu-zis.

Reacţia de fixare a complementului reprezintă o foarte bună metodă atît pentru diagnosticul propriu-zis, cît şi pentru identificarea unui germene izolat.

a) *Folosirea reacţiei în scop diagnostic. Produse necesare:*
- serul de diagnosticat;
- ser imun standard;
- antigene standard;
- antigen normal;

— alexină, sistem hemolitic, lichid diluant.

Serul de diagnosticat se recoltează în mod obișnuit la începutul afecțiunii, la 3 săptămîni și la 6 săptămîni de la debut; aceasta deoarece anticorpii fixatori de complement apar în serul bolnavilor, în mod obișnuit la 2—3 săptămîni și ating un titru maxim, la 5—9 săptămîni de la debut, după care încep să descrească; la 11—12 luni, ei dispar din sîngele circulant.

Serul va fi inactivat 30 de minute la 56° și apoi conservat la gheață, de preferință congelat.

Reacția se va executa paralel cu toate probele de ser, recoltate de la bolnav, dinamica titrului anticorpilor constituind elementul de bază pentru diagnosticul afecțiunii.

Serul imun standard se obține de la convalescenți (în a 5-a — a 9-a săptămînă de la debut) sau pe animale de laborator.

Pentru prepararea serului pe animale de laborator s-au preconizat multiple metode, cele mai bune rezultate obținîndu-se pe hamster sau șobolanul alb adult, imunizați după metoda adăugării la antigen a substanțelor adjuvante lipidice. Serul poate fi obținut și pe iepuri inoculați la 6 zile interval cu 5 ml suspensie virulentă, alternativ peritoneal și muscular. Se folosesc 5 inoculări.

Antigenele standard se obțin din creierul șoarecilor infectați experimental sau pe culturi celulare.

Pentru prepararea antigenelor s-au preconizat numeroase metode. Pentru antigenele-șoarece cele mai bune rezultate se obțin cu tehnica de extragere cu acetonă și eter, preconizată de Casals, metodă pe care o recomandăm[1].

Antigenele celulare se obțin mai bine pe celule Detroit-6 sau de preferință, pe celule renale de embrion de oaie (Gaidamovici și colab.).

Culturile de rinichi embrionar ovin se obțin prin tripsinizare, folosindu-se pentru creștere un mediu pe bază de hidrolizat de lactalbumină (0,5%) și 20% ser bovin.

Cele mai bune rezultate se obțin prin folosirea unor culturi tinere (3—5 zile). După infectare, se folosește ca mediu de menținere mediul 199 cu 10% ser bovin sau 1% gelatină.

Lichidul de cultură se recoltează la 3 zile, dacă distrugerea celulară este totală sau la 4 zile, dacă ECP este slab.

Se centrifughează 20 de minute la 1 000 turații/min. Lichidul supernatant (antigenul) se conservă la + 4°.

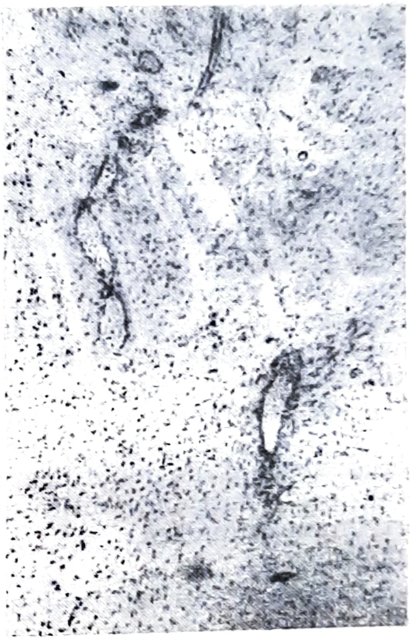


Fig. 537. — Secțiune prin creierul unui șoarece infectat experimental cu virusul encefalitei slovace.

Pentru distrugerea calităților patogene, antigenul este inactivat cu soluție de albastru de metilen[2], căldură sau R.U.V.

Antigenul normal se prepară după aceeași metodă ca antigenul standard din sistemul nervos al animalelor normale, neinfectate sau din culturi celulare neinfectate.

Lichidul diluant. Se recomandă folosirea tamponului veronal, date fiind rezultatele superioare celor obținute cu alte lichide diluante.

Tehnica reacției. Reacția se execută în tuburi sau pe plăci după schemele obișnuite, fixarea făcîndu-se la ghețar la + 4°, timp de 18—20 de ore, cu incubație ulterioară de 30 de minute la 37°. În reacție se introduc martori de antigen normal și de ser imun standard.

Rezultate. Trecerea de la o reacție negativă la o reacție pozitivă, creșterea titrului de 4 ori în decursul bolii sau rezultatele constant pozitive ale reacției de fixare la un titru minim de 1/4 (chiar fără creșterea titrului) trebuie considerate ca o dovadă a infectării cu virusuri encefalitice și deci criterii utile diagnosticului [1].

---

[1] Dat fiind pericolul de contaminare a cercetătorilor cu antigene encefalitice, este necesară iradierea cu ultraviolete a acestor antigene timp de 90 de minute. Prin acest procedeu antigenul nu-și micșorează activitatea, dar devine nepatogen.

[2] Se adaugă albastru de metilen (soluție alcoolică) pentru a se ajunge la o concentrație finală de 10^{-6}. Tuburile sau flacoanele menținute în cristalizatoare cu gheață sînt apoi iradiate cu R.U.V. (lampă 200 Watt) 15—30 de minute, la o distanță de 35 cm.

b) *Utilizarea reacției pentru identificarea unui virus izolat pe animal sau în culturi celulare.* Reacția se execută după aceleași criterii ca cele arătate mai sus, folosindu-se însă un antigen preparat cu virusul izolat.

Deși unii autori consideră că reacția de fixare a complementului poate fi folosită pentru identificarea tipului de virus encefalitic, marea majoritate a specialiștilor apreciază valoarea reacției limitată numai la precizarea diagnosticului de encefalită virotică, nu și a tipului respectiv (specificitate de grup). Pentru precizarea tipului de virus encefalitic, se recomandă utilizarea reacției de neutralizare.

Reacția de neutralizare. Material necesar :

— material virulent de identificat;
— tulpini de virusuri encefalitice cunoscute;
— seruri imune, standard;
— ser normal.

Materialul virulent de identificat este constituit fie din emulsii de creier provenite de la șoarecii infectați experimental, fie din mediul nutritiv recoltat din tuburi de cultură inoculate cu virusul respectiv, recoltate în momentul unui efect citopatic evident.

Se va lucra cu un material infecțios în prealabil titrat.

Tulpinile standard sînt constituite din virusuri encefalitice cunoscute, întreținute în laborator pe animale sensibile sau în culturi celulare.

Serurile imune standard se obțin pe iepure, hamster sau șobolan, după aceleași tehnici ca pentru R.F.C., putînd fi utilizate și seruri de convalescent în prealabil verificate.

Serul normal va proveni de la aceeași specie animală de la care s-au obținut serurile standard.

Atît serurile standard, cît și cele normale vor fi folosite după inactivare 30 de minute la 56°.

Tehnica reacției de seroneutralizare este cea obișnuită, diferind însă timpul de contact între serul imun și virus. Astfel, se recomandă menținerea amestecului ser + virus 9 ore la 37° și răcirea ulterioară la frigider.

Inocularea amestecului ser + virus se va face fie la șoarece, fie în culturi celulare. În cazul experimentării pe șoarece, inocularea se va face pe cale cerebrală, iar în cazul unei tulpini sigur patogene și pe cale extraneurală, pe cale peritoneală. Calea extraneurală este recomandată de unii specialiști care susțin că inocularea cerebrală este mult prea severă pentru a putea decela cantități infime de anticorpi neutralizanți.

Animalele inoculate vor fi urmărite timp de 14 zile.

În cazul efectuării reacției în culturi celulare *(metodă recomandată)*, se vor prefera celulele Detroit-6 sau celulele embrionare umane. Testul de culoare poate fi de asemenea utilizat.

Rezultatele se apreciază în comparație cu martorii, după criteriile obișnuite.

În scopul unui diagnostic serologic propriu-zis, reacția de seroneutralizare nu este decît cu totul excepțional folosită.

Este mai frecvent utilizată pentru diagnosticul retrospectiv, dat fiind că anticorpii neutralizanți care apar în a 2-a săptămînă de boală se mențin cîțiva ani la titruri înalte. Aceasta explică de ce, pentru precizarea diagnosticului este absolut obligatoriu studiul dinamicii anticorpilor neutralizanți.

Alte metode serologice. Demonstrarea calității hemaglutinante a unor virusuri encefalitice (japonez, B, West Nill, St. Louis, ecvin de West, rus de primăvară-vară) a adus noi perspective pentru diagnosticul acestei afecțiuni.

Mărirea activității aglutinante a antigenelor prin folosirea acetonei și eterului (Casals) pentru extragere și mai recent, dovedirea împărțirii virusurilor encefalitice în 3 grupuri imunologic distincte, pe baza hemaglutinoinhibărilor încrucișate, au adus speranța obținerii unui diagnostic rapid.

Într-adevăr, folosirea virusului West Nill, spre exemplu, ca antigen în reacția de hemaglutinare a permis stabilirea diagnosticului de encefalită prin inhibarea acestei hemaglutinări de către serurile provenind de la bolnavii cu diferite encefalite din acest grup (encefalită slovacă, rusă de primăvară-vară etc.).

În consecință, un virus encefalitic izolat trebuie cercetat și din punctul de vedere al calităților hemaglutinante, iar în diagnosticul serologic propriu-zis trebuie urmărită (preferabil în dinamică) și calitatea hemaglutinoinhibantă a serului față de un virus encefalitic hemaglutinant.

---

[1] Trebuie cunoscută existența unor cazuri tipice de encefalită, diagnosticate prin izolarea virusului, dar cu lipsa anticorpilor serici fixatori de complement (V. Bardoș).

Antigenul folosit este obținut cu cele mai bune rezultate din creierul șoarecilor sau șobolanilor pui, inoculați cu o tulpină verificată și pregătită fie după metoda Casals cu acetonă-eter, fie cum se recomandă de foarte scurt timp, cu sulfat de protamină și sucroză-acetonă, dar mai ales cu un virus cultivat în culturi celulare (metodă recomandată).

Într-adevăr, cercetările efectuate în ultima vreme, în special de Gaidamovici și colab., au adus date de cea mai mare utilitate în această direcție.

Hemaglutinina encefalitică se obține cel mai bine pe celule renale de embrion de oaie (mediu de menținere 199, temperatura de incubare 37°).

După 3 zile de la infectare, lichidul de cultură este extras, supus înghețului și dezghețului și centrifugat 10 minute la 1 500 turații/min. Lichidul supernatant constituie antigenul hemaglutinant, care menținut 7 zile la 37°, își pierde infectivitatea. Se conservă liofilizat, fără modificarea titrului, 10—14 luni.

Tehnica reacției de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare. Se folosesc eritrocite de gîscă, recoltate din vena subaxilară în soluție Alsever. Se păstrează la 4° (nu mai mult de o săptămînă). Înainte de întrebuințare, se spală în ser fiziologic și apoi se prepară o suspensie 0,5% în tampon-fosfat [1].

Diluțiile *de antigen* se realizează de asemenea în tampon-fosfat, cu $pH = 9$.

Reacția se lucrează în volum de 0,4 ml, avînd grijă să se corecteze pH la 6,8 (Gaidamovici și colab.). Temperatura optimă este de — 4°. Citirea reacției se face la 60 de minute.

Aspectul hemaglutinării produse de virusurile encefalitice este foarte asemănător cu cel produs de virusurile gripale.

Serurile de diagnosticat se tratează pentru îndepărtarea heteroaglutininelor cu eritrocite de gîscă [2], iar pentru inhibitorii nespecifici cu caolin [3], după care se inactivează 30 de minute la 56°. Diluțiile de ser se efectuează, de asemenea, în soluție tampon-fosfat.

În reacția de hemaglutinoinhibare se folosesc 8 u. HA. Contactul ser + antigen se face 8 ore la 4°, după care se adaugă eritrocitele. Reacția se citește la 60 de minute.

Se atrage atenția asupra necesității corectării pH la 6,8.

Cu această metodă reacția de HAI poate furniza rezultate cu caracter de tip, fiind deosebit de valoroasă, mai ales prin studiul anticorpilor hemaglutinoinhibanți în dinamică.

Concluzii

Diagnosticul de laborator al unei meningite produse de virusuri encefalitice și totodată diagnosticul unei encefalite virotice primitive se pot stabili prin izolarea virusului pe șoarece și mai ales în culturi celulare și prin metode serologice.

Izolarea virusului poate fi realizată în special din sîngele bolnavului și numai în primele zile de boală.

Identificarea virusului se poate face prin reacția de fixare a complementului, dar mai ales prin reacția de seroneutralizare, iar pentru unele tulpini și cu ajutorul reacției de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare.

Diagnosticul serologic propriu-zis poate fi stabilit și cu ajutorul reacțiilor de hemaglutinoinhibare și fixare a complementului cu antigene standard și cu probe de ser recoltate în primele zile de boală și apoi la 2 și 4 săptămîni de la debut; un rezultat precis poate fi obținut în special prin studiul în dinamică al anticorpilor serici.

Reacția de seroneutralizare va fi folosită în special pentru identificarea unui virus izolat pe animal.

Proprietatea hemaglutinantă a unor virusuri encefalitice pentru hematiile de gîscă adultă sau pentru cele de pui de găină de o zi și inhibarea cu seruri omologe sau aparținînd aceluiași grup serologic (după clasificarea lui Casals) justifică recomandarea folosirii reacției de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare pentru diagnosticul serologic.

Rezultatele importante obținute în diagnosticul rapid prin folosirea anticorpilor fluorescenți în culturi celulare justifică introducerea în practică și a acestei metode.

DIAGNOSTICUL UNEI MENINGITE URLIENE

Participarea frecventă a virusului urlian în etiologia „meningitelor aseptice”, de foarte multe ori fără prinderea glandelor salivare, face ca, astăzi în diagnosticul unei meningite virotice laboratorul de specialitate să-şi dirijeze investigaţiile şi în această direcţie.

---

[1] $NaCl$ 1,5 M
Na_2HPO_4 0,5 M
NaH_2PO_4 1 M

[2] Suspensie de eritrocite de gîscă 10% în soluție tampon fosfat, 4 părți + ser, 1 parte; contact 30 de minute; centrifugare.

[3] Caolin fin, susp. 25% se pune în contact cu o cantitate egală de ser. Se agită energic 30 de minute și apoi se centrifughează 20 de minute la 1 500—2 000 turații/min.

Pentru diagnosticul meningitei urliene, ca de altfel şi pentru diagnosticul infecţiei urliene propriu-zise, laboratorul foloseşte metode de izolare a virusului şi metode serologice.

Izolarea virusului

Izolarea virusului urlian se face în modul cel mai convenabil în oul de găină embrionat, calea amniotică fiind calea de elecţie.

Ca *produse patogene* se vor folosi sîngele, lichidul cefalorahidian, mai rar saliva sau lichidul de spălătură bucală.

Ouăle embrionate vor fi folosite după incubare timp de 6—7 zile la 39°.

Calea de inoculare va fi cea intraamniotică. Inocularea se va practica cu fiecare produs în 4—6 ouă, care, după infectare, vor fi menţinute timp de 6—7 zile la temperatura de + 35°. Se scot din experienţă embrionii morţi în primele 3 zile. Nu vor fi consideraţi valabili în experienţă decît embrionii morţi după a 3-a zi sau cei rămaşi în viaţă şi sacrificaţi a 5-a — a 7-a zi.

Rezultatele inoculărilor se apreciază exclusiv prin apariţia calităţii hemaglutinante caracteristice virusului urlian.

Pentru evidenţierea acestei proprietăţi se va recolta lichidul amniotic al embrionilor morţi după 3 zile, ca şi al embrionilor sacrificaţi la 6—7 zile de la inoculare.

Recoltarea lichidelor se face după tehnica obişnuită, iar calitatea hemaglutinantă se controlează în prezenţa hematiilor de găină sau cobai, iniţial în cîte un tub pentru fiecare lichid. Lichidele pozitive vor fi titrate după tehnica obişnuită.

Trebuie ştiut că hemaglutininele urliene nu se dezvoltă totdeauna suficient de la prima trecere. Din această cauză trecerile pe alte ouă embrionate pe aceeaşi cale, sînt obligatorii în toate cazurile de hemaglutinare negativă. Calitatea hemaglutinantă trebuind să devină evidentă după a 3-a trecere, lipsa acesteia după aceasta permite concluzia unei încercări de izolare negativă.

Dimpotrivă, hemaglutinarea în titruri variabile, însoţită de un oarecare grad de hemoliză, inhibată de seruri imune, standard, constituie un criteriu ce permite stabilirea diagnosticului de infecţie urliană.

De curînd, s-au propus şi alte metode biologice de identificare a virusului urlian (inocularea la cobai în camera anterioară a ochiului sau inocularea la cobaii în prealabil imunizaţi şi aprecierea creşterii titrului anticorpilor fixatori de complement din serul acestor animale); deşi interesante, aceste metode nu şi-au dobîndit generalizarea.

Metode serologice

Unele metode serologice şi în special reacţia de fixare a complementului şi reacţia de hemaglutinoinhibare sînt folosite atît pentru identificarea unui inframicrob izolat, cît şi pentru diagnosticul propriu-zis al bolii.

Dacă pentru identificarea unui virus cele mai bune rezultate se obţin cu ajutorul reacţiei de hemaglutinoinhibare, pentru diagnosticul propriu-zis al afecţiunii cele mai bune rezultate se obţin cu ajutorul reacţiei de fixare a complementului.

Reacţia de fixare a complementului. *Produse necesare* :

— antigen standard;

— antigen normal;

— serul de diagnosticat (de preferinţă 2 probe recoltate la 10 zile interval);

— serul imun standard;

— alexină, sistem hemolitic;

— lichid diluant.

Antigenele standard se obţin cel mai comod pe oul de găină embrionat.

Trebuie cunoscut că în cazul virusului urlian se poate disocia un „*antigen corpuscular*" (antigenul V) şi un „*antigen solubil*" (antigenul S) distinct de masa corpusculară.

În reacţie se folosesc fie *antigene solubile*, cu avantajul, după unii autori, al furnizării de rezultate mai precoce, fie *antigene totale*.

Antigenul solubil se obţine din sacii amniotici sau de preferinţă din membranele corioalantoidiene ale embrionilor de găină infectaţi cu o tulpină de virus urlian adaptată la calea alantoidiană. În lipsa unei astfel de tulpini, se vor folosi membranele amniotice după infectarea intraamniotică.

După inoculare, ouăle se menţin la + 35° timp de 5 zile, cînd se sacrifică şi se recoltează membranele (alantoidiană sau amniotică, în funcţie de tulpina de virus folosită). Membranele se spală în ser fiziologic şi apoi se usucă cu ajutorul hîrtiei de filtru. Se cîntăresc, se triturează, de preferinţă într-un triturator mecanic şi se face o suspensie 1/5 în ser fiziologic, după care se centrifughează 10 minute la 2 000 turații/min.

Se recoltează lichidul superficial și se recentrifughează timp de 20 de minute la 20 000 turații/min ; lichidul supernatant constituie antigenul solubil.

Se adaugă mertiolat de sodiu 1/10 000 sau formol 0,05% și se conservă la + 4°.

Antigenul total se obține din ouăle embrionate, inoculate pe cale amniotică. Se recoltează, după 5 zile de incubare la + 35°, lichidul amniotic și sacii amniotici (după unii autori și sacii vitelini) care se triturează energic.

În cazul folosirii unei tulpini adaptate la calea alantoidiană, se vor folosi lichidul alantoidian și membranele corioalantoidiene.

Amestecul astfel obținut se centrifughează la 2 000 turații/min., timp de 10 minute, iar lichidul supernatant constituie antigenul utilizabil în reacția de fixare a complementului.

Pentru eliminarea puterii anticomplementare, pe care uneori o prezintă antigenele totale, se pot folosi mai multe tehnici de purificare.

Astfel, se poate supune antigenul timp de 48 de ore dializei contra unei soluții tampon-fosfat 0,11 M (pH = 7), la temperatura de + 4° sau unei centrifugări la 30 000—50 000 turații/min., timp de 30 de minute (centrifugă de rece).

Cu această din urmă tehnică sedimentul, reluat într-un volum convenabil de lichid diluant, va constitui antigenul purificat și concentrat.

Ca și antigenul solubil, antigenul total poate fi conservat în bune condiții 2—3 luni la ghețar, după adaos de mertiolat sau formol.

Antigenul normal se prepară din ouă embrionate, neinfectate, de aceeași vîrstă ca cele din care s-au preparat antigenele urliene, urmînd aceleași procedee ca cele folosite în cazul preparării antigenelor standard.

Serul de diagnosticat se recoltează la începutul bolii, la 10 zile și dacă este posibil și la 20—25 de zile de la debutul afecțiunii.

După recoltare, serurile vor fi inactivate 20 de minute la 60° sau 30 de minute la 56° și apoi conservate la ghețar la + 4° . . . — 15°, de preferință în fiole închise, practicîndu-se reacția cu toate probele o dată.

Înainte de efectuarea reacției, este utilă o nouă inactivare de 20 de minute, pentru îndepărtarea unor eventuale proprietăți anticomplementare.

Serul imun se obține de la convalescenții de oreion sau pe animale de laborator, în special pe cobai.

Serul de convalescent se recoltează de preferință după a 21-a zi de la debutul bolii. După inactivare prealabilă 20 de minte la 60° și control serologic, se recomandă amestecul cîtorva seruri cu titruri ridicate și stocarea lor la ghețar la + 4° sau de preferință la — 15°.

Serul imun de cobai se obține simplu, prin inocularea subcutană a 1 ml lichid amniotic sau alantoidian (în funcție de tulpină), cu titrul hemaglutinant ridicat (1/320—1/640) de 3 ori la 8 zile interval. La 8 zile de la ultima inoculare cobaiul se sîngerează, iar serul obținut se inactivează și se conservă ca și serul uman.

Alexina și sistemul hemolitic se obțin după procedeul obișnuit.

Tehnica reacției de fixare a complementului se execută de preferință la rece.

Este recomandabil a se începe seria diluțiilor de ser cu diluția 1/8, considerată ca pragul minim valabil pentru diagnostic, iar antigenul să fie diluat astfel, încît volumul respectiv să conțină 2 unități antigenice.

În cazul folosirii antigenului solubil se recomandă, în scopul eliminării reacțiilor nespecifice, a se proceda la o adsorbire prealabilă a serului. În acest scop, se va pune în contact pentru 30 de minute, la temperatura laboratorului, serul inactivat cu o cantitate egală dintr-o suspensie de hematii de berbec 10% sau cu o suspensie de membrane corioalantoidiene normale 10%, în lichid diluant, după care se face o centrifugare ușoară, se recoltează serul și se utilizează în reacție.

Rezultate. Anticorpii fixatori de complement apar precoce în serul bolnavilor de oreion. Astfel, anticorpii corespunzători ai antigenului S apar din a 3-a zi, cei corespunzători antigenului V din a 5-a—a 7-a zi.

Titrurile atinse sînt în general mici. Ele depășesc foarte rar valorile de 1/8—1/16 în primele 5—7 zile, dar sînt egale sau superioare diluțiilor 1/32 în ziua a 10-a, pentru ca în a 20-a zi de boală să atingă în marea majoritate valori de 1/64—1/128 și rar, chiar mai mari. La foștii bolnavi de oreion se pot găsi încă mulți ani reacții pozitive la titruri de 1/16—1/32.

Dat fiind însă că în decursul altor afecțiuni aceste titruri nu se măresc aproape de loc, constatarea unei creșteri a titrului anticorpilor fixatori de complement în decursul bolii constituie un criteriu important pentru stabilirea diagnosticului unei infecții urliene. De altfel, reacția de fixare a complementului permite stabilirea diagnosticului chiar și fără un studiu dinamic (o singură probă de ser recoltată în perioada de stare a bolii justifică, prin găsirea unui titru de 1/32—1/64, afirmarea infecției urliene).

Reacția de hemaglutinoinhibare constituie cea mai importantă probă serologică pentru identificarea unui virus urlian izolat pe organismele sensibile, pe oul embrionat în special.

Dar în afară de aceasta, proba hemaglutinoinhibării poate fi folosită și pentru diagnosticul propriu-zis al afecțiunii, prin depistarea în serul bolnavilor și în special al convalescenților de oreion a anticorpilor inhibitori ai hemaglutininelor urliene.

a) *Folosirea reacției în scopul diagnosticului propriu-zis.*

Produse necesare:

— antigen urlian;
— serul de diagnosticat;
— ser imun standard;
— suspensie de hematii;
— lichid diluant.

Antigenul urlian folosit în reacția de hemaglutinoinhibare este constituit din lichidul amniotic recoltat din ouăle embrionate infectate cu o tulpină de virus urlian, verificată și întreținută pe această cale. Lichidul amniotic va fi recoltat la 5 zile de la inocularea amniotică a embrionilor de găină în vîrstă de 7 zile.

Deși lichidele amniotice își mențin, la + 4°, valabilitatea cîteva săptămîni, pentru a obține bune rezultate recomandăm folosirea în reacție a unor lichide amniotice proaspete, nu mai vechi de 10 zile, sau a lichidelor conservate cu ajutorul glicerinei neutre (lichid amniotic + glicerină pură neutră în părți egale). (Nu se vor conserva niciodată antigenele hemaglutinante la temperaturi sub 0°, deoarece prin acest procedeu calitățile hemaglutinante scad vizibil.)

Se vor folosi numai lichide cu titruri înalt hemaglutinante (1/640 sau mai mari).

Serul de diagnosticat va fi recoltat după tehnica uzuală. Dată fiind apariția mai tardivă a anticorpilor hemaglutinoinhibanți în serul bolnavilor (a 8-a—a 10-a zi), ca și a prezenței anticorpilor inhibanți la persoane indemne — este adevărat că la un foarte mic număr — se recomandă recoltarea a cel puțin 2 probe de sînge la interval de 10 zile.

După separarea serului, acesta va fi inactivat 20 de minute la 60° sau 30 de minute la + 56° și apoi conservat în fiole închise la gheţar, la + 4° sau la temperaturi inferioare.

Serul imun standard folosit în reacție va proveni de la convalescenții de oreion, fiind recoltat după a 25-a zi de la debut, sau de la cobaii pregătiți conform indicațiilor date.

După inactivare 20 de minute la 60° sau 30 de minute la 56° și controlul puterii hemoglutinoinhibante, serul se conservă la gheţar la + 4° sau de preferință la — 15°... — 20°, timp îndelungat.

Suspensia de hematii se realizează cu globule roșii de găină sau cobai.

Lichidul diluant folosit: ser fiziologic 9‰.

Tehnica reacției este cea obișnuită, putînd fi executată în tuburi sau pe plăci, folosindu-se 8 unități hemaglutinante.

Reamintim faptul că hemaglutinarea produsă de virusul urlian se însoțește constant și de un oarecare grad de hemoliză.

Rezultatele reacției de hemaglutinoinhibare au o importanță diagnostică numai prin constatarea diferențelor de titru între probele de ser precoce și tardive. În mod normal, se vor lua în considerare numai titrurile superioare lui 1/80.

b) *Folosirea reacției în scopul identificării unui virus izolat.* După cum am arătat, această reacție are o indicație majoră pentru identificarea unui virus hemaglutinant izolat pe oul embrionat.

Pentru a nu repeta elementele descrise mai sus, precizăm că pentru acest scop sînt necesare:

— antigenul de identificat (lichidul amniotic hemaglutinant obținut din ouăle embrionate inoculate cu germenul de diagnosticat);
— antigen standard (obținut conform indicațiilor de mai sus);
— ser imun;
— suspensie de hematii.

Tehnica reacției este cea obișnuită.

Rezultatele reacției de hemaglutinoinhibare, pozitive cu serul imun standard, apreciate în comparație cu martorii, permit identificarea virusului izolat ca virus urlian și în consecință, certifică diagnosticul.

★

Anticorpii fluorescenți deși au adus în mîna unor experimentatori date extrem de interesante pentru cunoașterea unor mecanisme privind relațiile dintre virusul urlian și celula gazdă (Lešo și colab.), nu au intrat în practica laboratorului de diagnostic, mai ales că metodele folosite pînă acum, în parte descrise, aduc date foarte satisfăcătoare.

Concluzii

Diagnosticul unei meningite urliene, ca de altfel și al diferitelor forme clinice ale oreionului se poate stabili în perioada de debut a bolii, prin izolarea virusului specific din salivă, lichid cefalorahidian sau sînge, prin inocularea în sacul amniotic al oului de găină embrionat.

Decelarea prezenței și dezvoltării virusului urlian în ouă de găină embrionate se face în special cu ajutorul reacției de hemaglutinare, iar identificarea virusului prin proba hemaglutinoinhibării.

În perioada de stare, ca de altfel uneori și în perioada de debut, date extrem de utile pot fi furnizate atît de reacția de hemaglutinoinhibare, reacție simplă și cu excelente rezultate mai ales cînd este folosită în dinamică, precum și de reacția de fixare a complementului, reacție serologică de elecție datorită, atît precocității pozitivării ei cît și faptului că studiul în dinamică nu este indispensabil.

În perioada de convalescență, ca și pentru diagnosticul retrospectiv, date foarte utile pot furniza atît reacția de fixare a complementului, cît și reacția de hemaglutinoinhibare.

Dat fiind însă că și în această viroză se pot întîlni forme inaparente clinic, deci imunizări oculte, pentru un diagnostic serologic de precizie (în lipsa izolării virusului), se recomandă urmărirea dinamicii anticorpilor serici, indiferent de tipul lor (fixatori de complement, hemaglutinoinhibanți etc.).

DIAGNOSTICUL UNEI MENINGITE HERPETICE

Ajutorul laboratorului este extrem de rar cerut pentru diagnosticul unei infecții herpetice obișnuite; el este însă cu totul util pentru elucidarea etiologiei unui sindrom meningian sau meningo-encefalitic, ce acompaniază o erupție herpetică, mai mult sau mai puțin manifestă. În astfel de cazuri virusologul este chemat nu atît să izoleze virusul herpetic din veziculele cutanate sau mucoase, cît să identifice virusul în lichidul cefalorahidian.

Din această cauză, pentru diagnosticul unei meningite herpetice, singură *izolarea virusului* este recomandabilă, probele serologice studiate în dinamică neaducînd un aport util, decît în cazurile în care meningita nu se însoțește de manifestări eruptive.

Pentru izolarea virusului, pînă în prezent se întrebuința aproape exclusiv inocularea iepurelui pe cale corneeană sau cerebrală. În ultima vreme, datele obținute de diferiți cercetători recomandă înlocuirea animalului de experiență cu diferite celule cultivate *in vitro*. Metoda este mai simplă, mai comodă și totodată mult mai rapidă (48–96 de ore).

Tehnica de izolare a virusului din meningita herpetică este practic aceeași cu cea folosită pentru izolarea unui virus herpetic din leziunile eruptive caracteristice (diferă produsul patogen: lichidul vezicular într-un caz, lichidul cefalorahidian în celălalt).

Izolarea virusului în culturi celulare

Pentru izolarea și cultivarea virusului în culturi celulare, extrem de bune rezultate se obțin prin folosirea celulelor de embrion uman (I. Aderca și colab.)

Pregătirea celulelor, mediile de creștere și menținere, ca și inocularea se practică după indicațiile obișnuite.

Rezultatul unei inoculări pozitive se apreciază prin efectul citopatic indus, în bună parte caracteristic pentru acest virus. Modificările apar evidente și extrem de repede (48–72 de ore). Ele se caracterizează prin rotunjirea celulelor, care devin inegale, unele căpătînd dimensiuni chiar mai mari ca cele normale și, spre deosebire de celulele distruse de virusul poliomielitic sau E.C.H.O., ele sînt nefragmentate (fig. 538).

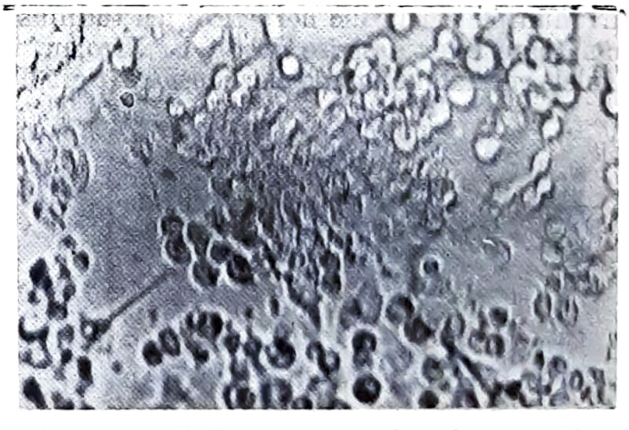


Fig. 538. — Efect citopatic produs de virusul herpetic în culturi de celule embrionare umane la 72 de ore de la inoculare. Preparat necolorat.

De remarcat că în tulpinile inoculate cu diluții mari de virus, leziunile apar sub formă de insule izolate ce se măresc treptat ca „o pată de ulei". Unele celule rămîn legate de altele prin punți ce formează uneori o adevărată rețea.

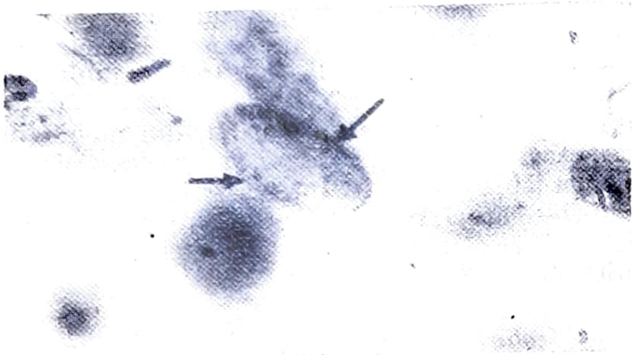


Fig. 539. — Efect citopatic produs de virusul herpetic; detaliu. Incluziuni nucleare într-o celulă de embrion uman; 96 de ore de la inoculare (colorație Giemsa).

Pe preparatele colorate, leziunile caracteristice apar evidente mai ales la nivelul nucleului. Acesta este umflat; cromatina, uneori cu aspect normal, alteori sub formă de grunji, este împinsă la periferie. În interiorul nucleului apar colonii de virus, pulverulente, cu condensări multiple (incluziile herpetice), cu totul asemănătoare celor descrise de Șt. S. Nicolau, în celulele encefalului animalelor sensibile (fig. 539).

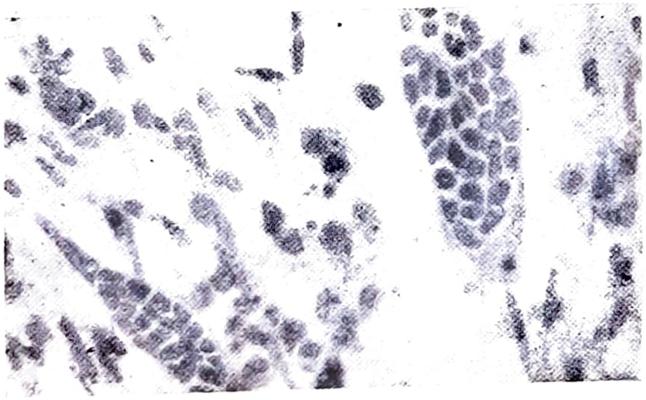


Fig. 540. — Efect citopatic produs de virusul herpetic; detaliu. Celule gigante multinucleate (colorație Giemsa).

Nucleolul mărit de volum este des aruncat la periferie. Semnalăm apariția a numeroase celule gigante cu 5—70 de nuclei situați mai ales în centrul celulei (fig. 540).

Într-o fază mai înaintată atît nucleul, cît și citoplasma se retractă.

Metode serologice

Reacția de seroneutralizare. Pentru identificarea unui virus herpetic izolat, deși pentru diagnostic de cele mai deseori este suficient numai aspectul efectului citopatic, se recomandă folosirea *reacției de neutralizare* cu seruri imune standard, cu rezultate excelente și de asemenea, cu mult mai rapide decît inocularea pe corneea scarificată sau intracerebrală la iepure (din ce în ce mai rar întrebuințată).

Serurile imune se prepară cu cele mai bune rezultate pe cobai.

Dintre numeroasele tehnici propuse, vom descrie pe cea inițiată de M. E. Hayward:

Se inoculează în derma regiunii metatarsiene a cobaiului cîteva picături dintr-o suspensie de virus herpetic 1/10.

La 2 – 4 zile de la inoculare, în plin stadiu inflamator al leziunii, se excizează cu ajutorul unei foarfeci curbe epiderma infectată. După triturarea în mojar cu nisip de cuarț, se face o suspensie de 1/10 și se centrifughează 10 minute la 3 000 turații/min. Lichidul supernatant, conservat la ghețar, la —10... —30°, constituie antigenul care se inoculează la cobai intradermic, în regiunea plantară a labei posterioare și apoi după 35 de zile subcutanat (1ml). La 14 zile de la această ultimă inoculare, animalul este sîngerat, iar serul obținut este fiolat și menținut la ghețar (— 10°, — 30°).

Tehnica reacției de seroneutralizare în culturi celulare este cea obișnuită, cu recomandarea ca amestecul virus + ser imun să se mențină la temperatura laboratorului timp de 2 ore.

Trebuie să atragem atenția că izolarea unui virus herpetic nu traduce întotdeauna o strînsă relație etiologică, dată fiind prezența frecventă a acestui virus în organismul uman, cu sau fără manifestări clinice.

Pentru precizarea diagnosticului, izolarea virusului din lichidul cefalorahidian va putea fi acompaniată și de studii serologice, în special de reacția fixării complementului.

Această probă va trebui efectuată și independent de izolarea inframicrobului în cauză, mai ales că nu totdeauna încercările de izolare sînt urmate de rezultate pozitive.

Reacția de fixare a complementului. Această probă, pe care majoritatea autorilor o considerau cu totul nesatisfăcătoare, a intrat în practică abia în ultimii ani, o dată cu descoperirea unor noi tehnici de preparare a antigenelor purificate.

În mod obişnuit, reacţia de fixare a complementului nu reprezintă decît un examen de laborator complementar, iar valoarea răspunsului obţinut depinde în special de posibilitatea urmăririi în timp a titrului anticorpilor fixatori de complement.

Din această cauză nu ne vom mărgini în a testa o probă din serul bolnavului, ci cel puţin două : una recoltată la începutul afecţiunii, iar a doua la 15—20 de zile de la debut.

Un rezultat cert pozitiv va putea fi susţinut numai dacă titrul anticorpilor fixatori de complement va prezenta o creştere evidentă în convalescenţă, în raport cu titrul iniţial.

Într-adevăr, majoritatea autorilor care s-au ocupat de această problemă descriu un titru scăzut în primele zile ale afecţiunii şi o creştere evidentă după 10—14 zile.

Pentru prepararea antigenului, vom descrie, dintre numeroasele metode propuse, o tehnică ce foloseşte cobaiul şi o alta oul embrionat.

Tehnica de preparare a antigenului pe cobai (Bedson). Se recoltează steril fragmente cu leziuni caracteristice din pielea metatarsului după inocularea intradermică şi se triturează în mojar, realizîndu-se o diluţie de 1/10 în tampon-fosfat M/50 cu pH = 7,6.

Se centrifughează cîteva minute la turaţie mică şi lichidul superficial, conservat la gheţar, reprezintă un bun antigen.

Tehnica de preparare a antigenului pe oul embrionat (Dudgeon). Se inoculează cu o tulpină de virus herpetic, adaptată pe ou, embrioni de 11 zile, pe cale corioalantoidiană. După menţinerea la +36°, timp de 48 de ore, se recoltează membranele care prezintă leziuni confluente şi se titrează cu atenţie, realizîndu-se o diluţie de 1/5 în soluţie tampon veronal. După 6 îngheţuri şi dezgheţuri succesive se centrifughează 60 de minute la 2 500—3 000 turaţii/min. Lichidul superficial conservat la —20° reprezintă antigenul pentru reacţie.

În afară de antigenul herpetic, pentru reacţie va trebui pregătit un *antigen normal*, preparat din ţesuturi sau lichide embrionare neinoculate după aceeaşi tehnică ca antigenul specific folosit.

Serurile de diagnosticat se folosesc după inactivare 30 de minute la 56° ; pînă la întrebuinţare se conservă la rece, de preferinţă congelate.

Serul imun standard se prepară pe cobai.

Tehnica reacţiei. Deşi R.F.C. se poate executa după oricare tehnică la rece, în tuburi sau pe plăci, considerăm util a descrie tehnica propusă de Hayward, care este uşor de executat.

În reacţie se folosec 0,2 ml din diluţia convenabilă de antigen [1], 0,2 ml din diluţiile de ser de diagnosticat (1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 şi 1/128), precum şi 0,2 ml complement (0,1 ml = 1 doză hemolitică).

Fixarea se realizează la rece, la + 4° timp de 18 ore, apoi la temperatura camerei timp de 30 de minute.

Se adaugă sistemul hemolitic 0,4 ml (din care 0,2 ml suspensie de hematii 2 % şi 0,2 ml ser hemolitic = 3 doze minime hemolitice).

Sistemul astfel realizat se introduce pentru 1/2 oră la + 37° în baie de apă, după care se face citirea. Se recomandă ca între hemoliza la 37° şi lectura rezultatelor să treacă 1—2 ore, în care timp sistemul va fi menţinut la temperatura camerei.

În interpretarea rezultatelor reacţiei de fixare a complementului, în infecţiile herpetice, va trebui să ţinem continuu seama de faptul că reacţia este foarte frecvent pozitivă la indivizii „normali" (17—82,5 %) ; studiul dinamic al anticorpilor fixatori de complement nu arată însă niciodată la „normali" o creştere a titrului lor, în timp ce la bolnavi creşterea este evidentă.

Concluzii

Pentru a diagnostica o meningită herpetică, cele mai bune rezultate se obţin prin izolarea virusului din lichidul cefalorahidian în culturi celulare şi controlul dinamicii titrului anticorpilor serici fixatori de complement.

În lipsa culturilor de celule, încercările de izolare a virusului trebuie făcute pe animal (iepure pe cale corneeană, şoarece pui, pe cale subcutanată). Identificarea unui virus izolat se va face mai ales cu ajutorul reacţiei de neutralizare cu seruri imune, standard.

Paralel cu încercările de izolare a virusului, precum şi în convalescenţă, reacţia de fixare a complementului cu serul bolnavului studiat dinamic este cea mai indicată.

Rezultatele vor trebui interpretate ţinînd seama şi de posibilităţile de izolare a virusului herpetic de la indivizi „sănătoși''. Izolarea virusului din cazuri de meningite neînsoțite de manifestări tegumentare sau mucoase herpetice, cu evidențierea creșterii anticorpilor fixatori de complement în timp sînt însă elemente semnificative pentru un diagnostic etiologic.

---

[1] Titrarea antigenului se face după tehnicile uzuale.

DIAGNOSTICUL ALTOR MENINGITE VIROTICE

Diagnosticul unor „ meningite atipice'' produse de virusuri aparținînd grupului E.C.H.O., *Coxsackie*, poliomielitic, gripal etc. se stabilește după indicațiile descrise în capitolele dedicate afecțiunilor respective.

Concluzii generale

Dat fiind numărul mare de inframicrobi capabili să producă „meningite primitive'', inframicrobiologul va trebui să analizeze cu atenție, împreună cu medicul clinician și cu epidemiologul antecedentele, condițiile de mediu și simptomele clinice, pentru ca din numeroasele metode și tehnici de lucru să aleagă pe cele ce prezintă maximum de șanse de rezolvare rapidă a diagnosticului.

Pentru o cît mai perfectă rezolvare a problemei, se recomandă inoculări de produse patologice variate simultan la animale, ouă de găină embrionate și culturi de celule.

În acest sens se vor face inoculări de materii fecale în culturi celulare și la șoareci pui (suspiciune E.C.H.O., poliomielită, *Coxsackie*), de sînge și lichid cefalorahidian pe cale cerebrală la șoarece (coriomeningită limfocitară, encefalită), în culturi celulare (encefalită), sînge, lichid cefalorahidian, eventual spălături nazofaringiene, în oul de găină embrionat — cale amniotică (pentru gripă, oreion etc.).

Izolarea unui virus va trebui completată prin tehnici de identificare (serologice, biologice, morfopatologice). Acestea vor fi alese în funcție de diagnosticul de prezumție sugerat de primele rezultate ale experimentării.

De cele mai multe ori, alături de încercările de izolare a inframicrobului cauzal, se vor face și cercetări serologice (anticorpii serici respectivi fiind studiați în dinamică).

BIBLIOGRAFIE

ADERCA I. — Virusurile REO, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 128.

BALȘ M., NAFTA I., ZILIȘTEANU E., GRABNICU M. — *Microbiologia (București)*, 1961, nr. 5, p. 409.

BALȘ M., NAFTA I., ZILIȘTEANU E., NICULESCU I. GRABNICU M. — Microbilogia (București), 1962, vol. 7, nr. 6, p. 541.

BRONIȚKI AL. — Grupul adenovirusurilor, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 252.

BRONIȚKI AL.— Grupul virusurilor paragripale, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 242.

BUKRINSKAYA A. G., PAKTORIS E. A. — *Acta virol.*, 1960, vol. 4, p. 184.

CAJAL N. — Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane, Ed. Acad. R.P.R., București, 1958.

CHANOCK R. M. — *J. exp. Med.*, 1956, vol. 104, p. 555.

CONSTANTINESCU M. N. și MARINESCU GH. — Gripa, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 208.

CONSTANTINESCU M. N. și MARINESCU GH. — Rickettsioze umane, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 701.

DEREVICI A. — Gripa. Aspecte din problemă. Ed. Acad. R.P.R., București, 1959.

DREIZIN R. S. — Kukovodstvo po laboratornoi diagnostike grippa, paragripoznîh, adenovirusnîh zabolevanii, Medghiz, Moscova, 1960, p. 142.

GOLDWASSER R. A., SHEPARD C. C. — *J. Immunol.*, 1958, nr. 80, p. 122.

GORBUNOVA A. S., SOKOLOV M. I. — Rukovodstovo po laboratornîi diagnostike gripa, paragripoznîh i adenovirusnîh zabolevanii, Medghiz, Moscova, 1960.

JDANOV V. M. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1962, vol. 13, nr. 4, p. 435.

JDANOV V. M. — Epidemiologhia, Medghiz, Moscova, 1961.

MONACI V. — La settimana degli ospedali, 1961, vol. 3, nr. 3—4, p. 28.

MUȘEȚEANU C. — *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1960, vol. 178, p. 426.

NICOLAU S. și CAJAL N. — *Microbiologia (București)*, 1962, nr. 2, p. 97.

NICOLAU S. și colab. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1963, vol. 14, nr. 1, p. 75.

PETRESCU AL. — Guturaiul, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, București, 1962, p. 245.

PREDESCU L. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1961, vol. 12, p. 233.

ROWE W. P., HUEBNER J. R. — *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1956, vol. 5, p. 453.

SABIN A. — *Science*, 1959, vol. 130, p. 1387.

SĂRĂȚEANU D. — Ornitoza, Ed. Acad. R.P.R., București, 1963.

SMORODINȚEV A. A., SELIVANOV A. A. — *Vop. Virusol.*, 1959, vol. 6, p. 648.

SMORODINȚEV A. A. Jr. — *Acta Virol.*, 1962, vol. 6, nr. 4, p. 338.

DIAGNOSTICUL INFECȚIILOR PROVOCATE DE ENTEROVIRUSURI

În grupul enterovirozelor au fost încadrate infecțiile produse de virusurile poliomielitice, *Coxsackie* și E.C.H.O. Recent, Ciumakov și colab. au propus ca în acelaș grup să intre și infecțiile determinate de virusul Karaganda, iar N. Constantinescu, N. Cajal și colab. și-au exprimat părerea că și hepatita epidemică poate fi considerată o enteroviroză.

În acest capitol însă, pînă la definitivarea cadrului grupului enterovirusurilor, ne vom ocupa numai de infecția poliomielitică, de grupul *Coxsackie* și de infecțiile cu virusuri E.C.H.O.

DIAGNOSTICUL POLIOMIELITEI

Datorită progreselor deosebite pe care le-au făcut culturile celulare, diagnosticul poliomielitei nu mai constituie astăzi o problemă. Rezultatele excelente obținute în această direcție au făcut ca aproape toate celelalte mijloace pe care inframicrobiologul le utiliza în trecut (inocularea la maimuțe) să fie total abandonate.

În consecință, în laboratoarele de virusologie diagnosticul acestei enteroviroze se stabilește prin izolarea virusului în culturi celulare, prin unele metode serologice și (în cazuri letale) pe baza examenului histopatologic.

Izolarea virusului în culturi celulare

Ca materiale virulente, în mod obișnuit, se folosesc suspensiile de materii fecale, iar în cazuri letale și cele obținute din triturarea fragmentelor de sistem nervos central (măduvă, bulb).

Materiile fecale obținute de la bolnavi, în vase sterile, se mențin pînă în momentul folosirii la gheţar sau, de preferință, în congelator. Este indicat să se recolteze cel puțin două probe de materii fecale, deoarece excreția virusurilor poliomielitice se poate face uneori intermitent. Recoltarea probelor trebuie făcută la interval de 24–48 de ore.

În momentul întrebuințării, se iau fragmente din materiile fecale și se emulsionează în apă distilată sau în soluție Hanks sau Earle, obținîndu-se o diluție de aproximativ 1/10. Suspensia se introduce într-un balonaș cu perle, se agită puternic, de preferință într-un agitator și apoi se lasă în repaus 30 de minute la gheţar, de preferință sub 0°. Se recoltează lichidul supernatant și se centrifughează 15 minute la 3 000 turații/min. Cu lichidul supernatant obținut după centrifugare se face, după adăugare de antibiotice (penicilină 1 000 u.i., streptomicină 500 μg, Micostatin 100 u.i. pentru fiecare ml), inocularea tuburilor de cultură, după tehnica obișnuită.

Suspensiile de organe virulente se prepară din materialul prelevat necropsic, de obicei din sistemul nervos central.

Dată fiind bogăția în virus a bulbului și a măduvei, se vor preleva steril mici fragmente, în special de la aceste niveluri.

Cu fragmentele de țesuturi, triturate cu atenție în mojare în prealabil răcite, se fac suspensii 1/10 în lichide diluante, după care se centrifughează 5 minute la 2 000 turații/min. Se recoltează lichidul supernatant și se tratează cu antibiotice (penicilină 500 u.i. și streptomicină 250 μg, pentru fiecare ml); după 30 de minute de menținere la gheţar, materialul virulent poate fi inoculat în culturile celulare.

Culturile celulare. Se folosesc cele mai variate țesuturi, în funcție bineînțeles de preferințe și de posibilități, pregătite după tehnica tripsinizării ori linii celulare continue, umane sau animale, normale sau canceroase.

În mod obișnuit se folosesc, după tripsinizare, celulele renale de maimuță, celule de embrion uman total (metodă recomandată), deși și alte tipuri de celule pot da rezultate îndeajuns de satisfăcătoare (testicul, plămîn simian, amigdale, rinichi, testicul uman, mușchi, piele, plămîn embrionar uman etc.).

Dintre tulpinile celulare se folosesc cel mai des celule He-La, KB, Hep.$_2$, Detroit-$_6$, amniotice umane, inimă *Cynomolgus*, E.R.K. (rinichi embrionar de iepure) etc.

Pregătirea lor se face în conformitate cu indicațiile date.

Inocularea culturilor de celule se face, de asemenea, după tehnicile curente.

După inoculare, tuburile se mențin la 37°, iar citirea se face la 48, 72, 96, 120 de ore și eventual la 6 zile.

Rezultate. Dezvoltarea virusurilor poliomielitice în culturi celulare se apreciază prin modificările citopatice determinate, ce devin evidente între 2 și 5 zile de la infectare.

Modificările microscopice observate la examenul direct pe preparatele necolorate se caracterizează prin rotunjirea și creșterea refrigerenței celulelor, urmată de necrozarea, dispariția nucleului și lizarea treptată a majorității celulelor (fig. 541); în unele cazuri placardele de celule degenerate se desprind de pe pereții tubului și cad în mediul nutritiv. De remarcat că efectul citopatic cuprinde rapid întreaga cultură de celule (24—36 de ore de la apariția primelor modificări).

De reținut că sînt necesare 1—3 treceri pentru diferențierea unei activități citopatogene specifice de cele nespecifice, produse de diferite substanțe toxice din materiile fecale[1].

Dacă după 2 treceri efectul citopatic se menține, îl vom considera ca un important element de diagnostic prezumtiv și vom trece la identificarea agentului citopatogen izolat, prin probe de neutralizare cu seruri imune standard.

Cu ajutorul metodei culturilor celulare, izolarea de virusuri poliomielitice nu mai este o problemă. Procentajul rezultatelor pozitive este strîns legat de perioada în care se încearcă izolarea. Cele mai multe rezultate pozitive se obțin în primul și al doilea septenar, în al patrulea septenar procentajul devine mai mic și nul în a zecea săptămînă de la debut.

Trebuie semnalat că uneori deși virusul poliomielitic este cu siguranță eliminat de bolnavul studiat se poate întîmpla ca încercările de izolare să ducă la rezultate negative.

În aceste cazuri, va trebui să procedăm la o nouă inoculare de material provenit din aceeași probă de fecale sau, de preferat, dintr-un amestec de 2—3 noi emisiuni de materii fecale, creșterea cantității inoculului (0,5—1 ml), contactul prelungit (60 de minute) al suspensiei virulente cu stratul celular și apoi adaosul mediului nutritiv, introducerea eventuală a tuburilor infectate în aparatul de rotat, realizarea de 2—3 treceri oarbe, cu treceri la 4 zile, eventual nu numai cu lichidul de cultură, dar chiar cu înseși celulele desprinse mecanic de pe pereții tubului și supuse înghețului și dezghețului.

Dat fiind că, în afara virusurilor poliomielitice și alți germeni inframicrobieni eliminați prin materii fecale (în special enterovirusuri), pot produce efecte citopatice cu totul asemănătoare, orice izolare pe culturi celulare va trebui completată de îndată cu probe de neutralizare cu seruri imune, standard, de tip.

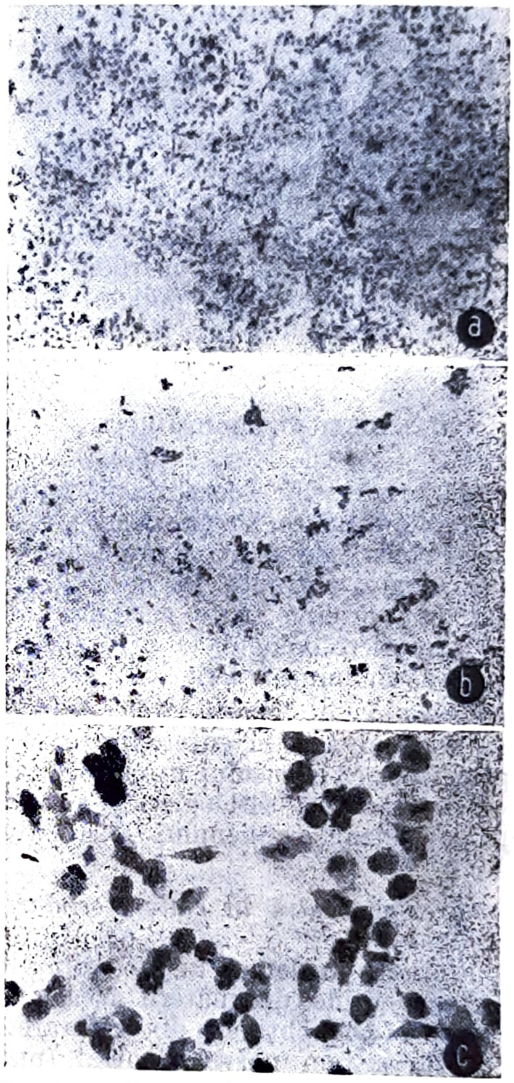


Fig. 541. — Culturi de celule HeLa, infectate cu virusul poliomielitic 1 (colorație hematoxilină-eozină).

a — efectul citopatogen la 10 ore de la inoculare; *b* — idem, la 36 de ore; *c* — idem, detaliu cu un obiectiv mai mare.

Identificarea virusului izolat prin reacția de seroneutralizare

Identificarea agentului citopatogen izolat se face în mod obișnuit prin reacția de neutralizare cu seruri antipoliomielitice, preparate în laborator.

Unii cercetători recomandă folosirea unui ser trivalent (amestec al celor trei tipuri de seruri existente în laborator), alții preferă să efectueze reacțiile separat, cu seruri monotip.

---

[1] În scopul reducerii toxicității materiilor fecale, se poate urma tehnica propusă de Enders.

Reacția se efectuează după tehnicile obișnuite cu 100 DIC_{50} din virusul izolat (dacă s-a făcut în prealabil titrarea) sau cu diluția de virus 1/100, separat cu fiecare tip de ser antipoliomielitic (I, II și III).

Serurile imune neutralizante de diagnostic se prepară pe animale de laborator (maimuțe, iepuri, capră etc.).

Dat fiind că serul imun obținut pe iepure este de o foarte bună calitate, vom descrie tehnica de preparare a serului exclusiv pe această specie animală. Bineînțeles că serul anti — se poate obține după multe tehnici. Dintre acestea vom alege pe cea recomandată de C. Ionescu-Mihăești și colab.

Se fac la iepuri inoculări intramusculare, de două ori pe săptămînă, timp de 3 săptămîni, cu cîte 5 ml antigen (lichid nutritiv recoltat la 3—4 zile de la inocularea culturilor de celule, centrifugat 20 de minute la 2 000 turații/min.).

La 10 zile de la ultima injecție, se face o inoculare de rapel cu 10 ml din același antigen, pe cale peritoneală. După trei zile de la injecția de rapel, se sîngerează animalul. Sîngele este lăsat să coaguleze 2 ore la 37°. Serul decantat după menținerea timp de 24 de ore la $+4^0$ se repartizează în fiole, se inactivează 30 de minute la 56° și apoi se conservă prin congelare la -20^0.

Cu această tehnică, C. Ionescu-Mihăești și colab. au obținut titruri ridicate cu specificitate de tip. Trebuie remarcată însă apariția anticorpilor de tip II la animale imunizate cu antigenul de tip III.

În tabelul 173 sînt redate titrurile obținute de autorii citați, cu tehnica descrisă.

TABELUL 173

Titrul anticorpilor antipoliomielitici de tip în serul iepurilor imunizați

Ser tip	Virus tip		
	I	II	III
I	1/5 120	0	0
II	0	1/1 280	0
III	0	1/320	1/320

Într-o serie de cercetări recente, împreună cu Cepleanu, Ianconescu și Aderca, folosind aceeași schemă, am obținut titruri superioare atunci cînd administrarea antigenului se făcea fracționat în teritorii diferite. Într-adevăr, injectînd cei 5 ml antigen în 5 teritorii musculare diferite (mușchii spatelui, coapsei etc.), în doze de cîte 1 ml, am obținut titruri mult crescute comparativ cu martorii, la care antigenul era introdus după tehnica obișnuită.

Trebuie cunoscut că, în culturi celulare, serul imun preparat pe iepure poate produce uneori lizarea sau aglutinarea celulelor de cultură. Această acțiune față de culturile celulare poate încurca uneori pe cercetător în aprecierea rezultatelor de neutralizare.

Serul normal se obține de la aceeași specie animală pe care s-a preparat serul imun, bineînțeles de la animale neinoculate. Aceste seruri vor fi folosite numai după ce, prin reacția de seroneutralizare, s-a stabilit că nu conțin anticorpi față de virusurile poliomielitice.

Tipul virusului izolat este stabilit prin tipul serului ce a reușit să neutralizeze virusul, să împiedice deci efectul citopatic.

Lipsa unui rezultat pozitiv, deși în mod obișnuit este suficient de elocvent pentru eliminarea diagnosticului de poliomielită, obligă la noi probe. Se urmărește în primul rînd eliminarea diagnosticului de poliomielită și în al doilea rînd identificarea agentului citopatogen ce poate aparține enterovirusurilor sau chiar altor grupuri de virusuri.

În eventualitatea, rară de altfel, a unei asocieri virotice, este necesară completarea probei de seroneutralizare cu alte procedee. Se va folosi în primul rînd inocularea la șoareci nou-născuți, care după cum se știe, sînt foarte sensibili la acțiunea patogenă a virusurilor *Coxsackie* și herpetic; în al doilea rînd, neutralizarea cu amestecuri de seruri anti-E.C.H.O. și, în sfîrșit, examinarea efectului citopatic de produs, după fixarea și colorarea culturilor celulare.

Cu această metodă se poate stabili diagnosticul diferențial cu herpesul, adenovirusurile și după unii autori, chiar cu unele virusuri E.C.H.O. (tipul 10 spre exemplu).

În interpretarea unei izolări pozitive de virus poliomielitic din fecalele unui bolnav, nu trebuie să se subestimeze și unele posibilități de eroare, dată fiind existența, mai ales în timp de epidemie, a excretorilor de virus în cursul unor infecții oculte, inaparente clinic. Există deci și posibilitatea unei coincidențe: asocierea unei afecțiuni oarecare (enterovirotică sau de altă natură), clinic aparentă, cu o poliomielită inaparentă clinic.

În acest caz izolarea virusului din fecale ar putea fără nici o îndoială să ducă la grave erori de diagnostic. Aceste situații, rare de altfel, nu trebuie însă să ducă la subaprecierea celui mai bun mijloc pe care-l avem la îndemînă pentru diagnosticul de laborator al poliomielitei : izolarea virusului.

Trebuie reamintit că izolarea virusului este posibilă în proporţii maxime (90—100%) atunci cînd încercările au loc *în primele zile de boală şi că şansele de izolare diminuează vizibil cu creşterea intervalului* ce ne separă de debutul bolii.

Nu trebuie subestimată nici posibilitatea inversă : existenţa unei poliomielite tipice, cu eşecul depistării germenului caracteristic.

În aceste cazuri, studiul anticorpilor prin reacţii serologice, în dinamică, este de un real folos.

Metode serologice

Datorită pe de o parte marelui procentaj de imunizări oculte ce face ca în serul unei mari majorităţi a persoanelor sănătoase să se găsească anticorpi specifici, în special neutralizanţi, iar pe de altă parte datorită faptului că în poliomielită anticorpii serici apar extrem de devreme, titrul ajungînd rapid la plafon, reacţiile serologice sînt puţin folosite pentru diagnosticul propriu-zis al afecţiunii.

Reacţiile serologice şi în special reacţia de seroneutralizare sînt folosite însă pe scară mare pentru stabilirea gradului de imunizare a unei populaţii, pentru anchete epidemiologice etc.

Dintre variatele reacţii serologice cunoscute, în poliomielită se folosesc mai ales reacţia de seroneutralizare şi cea de fixare a complementului. Alte reacţii avînd o aplicabilitate mai mică nu au intrat în practica uzuală, deşi unele din ele sînt intens susţinute de anumiţi autori.

În ultima vreme, cercetătorii ce caută cu febrilitate metode certe şi rapide de diagnostic îşi pun mari speranţe în *microtestul de precipitare luminiscentă*. Cercetări în curs de efectuare vor preciza valoarea acestui test.

Reacţia de seroneutralizare. Seroneutralizarea întrebuinţată în poliomielită cel mai frecvent pentru identificarea şi tiparea unui inframicrob izolat este foarte rar folosită pentru diagnosticul serologic propriu-zis; metoda este însă mult întrebuinţată pentru stabilirea gradului de imunizare a unei populaţii, pentru aprecierea evoluţiei epidemiologice, pentru precizarea eficienţei unor vaccinuri etc.

Deşi, practic reacţia poate fi efectuată în culturi celulare sau pe animalele de laborator sensibile, astăzi ea foloseşte exclusiv culturile de celule.

Trecem peste neutralizările efectuate în vederea identificării unui virus izolat, descrise mai înainte şi ne oprim asupra reacţiei pentru descoperirea şi identificarea anticorpilor neutralizanţi din serurile umane, efectuată în scop diagnostic, repetăm — rar folosită în scop diagnostic, datorită incidenţei crescute a serurilor pozitive în sînul unei populaţii, în special după primii ani de viaţă.

În rare ocazii, reacţia poate furniza date utile pentru diagnostic, însă numai prin studiul dinamicii titrului anticorpilor neutralizanţi faţă de unul din tipurile de virusuri poliomielitice.

Serul de diagnosticat se recoltează steril în două etape : o primă probă, în primele 2—3 zile de boală şi o a doua probă în convalescenţă sau la 30—35 de zile de la debut; se conservă la gheţar sau congelator, în fiole închise, pînă în momentul folosirii.

În cazul studiului incidenţei anticorpilor antipoliomielitici pe o populaţie oarecare, se va recolta în perfecte condiţii de sterilitate, o singură probă de sînge.

Antigenele sînt constituite din tulpinile de virus I, II, III, adaptate la culturi celulare (lichidele nutritive virulente), menţinute congelate în fiole închise.

Tehnica reacţiei este identică cu cea descrisă în cazul identificării unui virus poliomielitic. Se foloseşte însă o diluţie unică din fiecare tip de virus (100 DIC/50) şi diluţii crescînde din serurile de diagnosticat (1/2, 1/8, 1/32, 1/128). Reacţia de diagnostic se execută în acelaşi timp cu ambele probe de ser (acut şi convalescent).

Diagnosticul este stabilit numai dacă se constată o creştere semnificativă a titrului anticorpilor la proba a II-a în comparaţie cu I-a probă de ser.

Exemplu :

Tipuri de virus polio :	I	II	III
	Titrul pozitiv al serului		
Ser (proba I-a)	1/4	1/4	0
Ser (proba a II-a)	1/32	1/4	0

Din acest exemplu se poate stabili diagnosticul cert de poliomielită cu tipul I de virus.

Pentru o justă apreciere a acestui test trebuie să semnalăm faptul că unele infecţii cu virusuri E.C.H.O. pot determina o creştere importantă a anticorpilor antipoliomielitici, ceea ce arată, o dată în plus limitele reacţiei de seroneutralizare în diagnosticul clinic al poliomielitei acute.

Nu trebuie însă trecută cu vederea importanţa cu totul deosebită a acestei reacţii pentru anchete epidemiologice, pentru studiul incidenţei anticorpilor în populaţie etc.

Reacţia de fixare a complementului. Spre deosebire de reacţia de seroneutralizare, reacţia de fixare a complementului are o utilitate mult mai mare pentru diagnostic, datorită mai ales faptului că anticorpii fixatori de complement apar foarte repede şi se menţin numai scurt timp după vindecare.

Prin studiul acestor anticorpi, mai ales în dinamică, reacţia poate aduce date utile diagnosticului; ea poate să fie totodată folosită şi în anumite anchete epidemiologice, căci un titru pozitiv indică un contact relativ recent cu virusul poliomielitic.

Trebuie precizat că, de unde pînă recent reacţia furniza numai rezultate de grup, datorită unor cercetări făcute în special de Melnick şi colab. ea poate fi astăzi folosită cu succes şi pentru aprecierea tipului de virus poliomielitic.

Produse necesare:

- serul de diagnosticat;
- seruri imune, de tip;
- antigene standard;
- antigen normal;
- alexină, sistem hemolitic, lichid diluant.

Serul de diagnosticat şi serurile imune se obţin şi se tratează după aceleaşi indicaţii ca pentru reacţia de neutralizare.

Antigenele se obţin după mai multe tehnici din lichidele infectate provenind din culturi celulare. Dat fiind că în lichidele nutritive obţinute ca atare nu se găsesc întotdeauna cantităţi suficiente de antigen, s-au imaginat o serie de tehnici pentru concentrarea antigenului (dializă, ultracentrifugare, ultrafiltraţie etc.). De asemenea, deoarece deseori antigenele pot prezenta calităţi anticomplementare, pentru anihilarea acestei activităţi, antigenele preparate din culturi celulare vor fi încălzite timp de 30 de minute la temperatura de 56° sau prin purificare cu freon-fluorocarbon.

Cum însă purificarea cu freon este destul de laborioasă şi costisitoare, este recomandabil să se îndepărteze antigenele anticomplementare, să se lucreze numai cu antigene bune, verificate.

Antigenele se conservă în bune condiţii prin congelare la —15. . . —30°.

Antigenul normal se prepară din lichidul unei culturi celulare neinfectate, folosind aceleaşi procedee ca şi pentru prepararea antigenelor specifice.

Prepararea reagenilor ca şi *tehnica reacţiei*, urmează procedeul obişnuit.

Rezultate. Reacţiile cu seruri imune preparate pe animal şi adesea cu seruri umane sînt specifice. În mod obişnuit însă, serurile umane dau reacţii pozitive pentru toate 3 antigenele. Modificările de tehnică aduse reacţiei de Black şi Melnick (folosirea a 1—2 unităţi de antigen, în prezenţa unei mici cantităţi de complement) permit astăzi folosirea monovalentă a reacţiei.

Melnick a demonstrat de altfel şi existenţa a 2 tipuri de anticorpi fixatori de complement: „precoci" care dau mai ales reacţii heterotipice cu antigenul inactivat (H) (căldură, formol, R.U.V.) şi „tardivi", care dau reacţii homotipice cu antigene preparate din virusuri vii (N).

Deşi, în general, titrul anticorpilor atinge un prag maxim în primele zile, în mod obişnuit se poate totuşi constata, studiind dinamica anticorpilor, un titru mai mare în proba de ser recoltată în convalescenţă. Această creştere este mult mai evidentă decît cea stabilită de reacţia de neutralizare.

După Zacek, o reacţie de fixare a complementului, efectuată cu corectivul precizat de Melnick şi colab., poate decela o creştere de 4 ori sau chiar mai mare a titrului anticorpilor fixatori de complement la 84% din bolnavii acuţi; procentul devine şi mai mare (97%), atunci cînd se trece şi la evaluarea avidităţii.

Dat fiind că reacţia devine negativă la 4—5 săptămîni de la sfîrşitul bolii, pozitivitatea, chiar a unei singure probe de ser în reacţia de fixare a complementului, oferă concluzii utile pentru precizarea diagnosticului.

Metode histopatologice

În cazurile necropsice, în afară de metodele de izolare a virusului, de o mare utilitate pentru diagnostic este studiul histopatologic al fragmentelor de sistem nervos central recoltate de la cadavru.

Leziunile cele mai importante se întîlnesc la nivelul substanței albe și în special al celei cenușii din măduvă, în *pia mater*, la nivelul bulbului, protuberanței și scoarței cerebrale. Leziuni intense se întîlnesc și în *locus niger*.

Infiltrația din *pia mater* realizează o meningită cu limfocite, poliblaști, rare plasmocite și polinucleare. Aceste din urmă elemente sînt cu atît mai frecvente, cu cît moartea a survenit la o perioadă mai apropiată de debutul bolii.

La nivelul substanței albe, se observă o infiltrație redusă cu aceleași elemente celulare, dispuse uneori sub formă de manșoane perivasculare.

Leziunile cele mai intense se întîlnesc în substanța cenușie din coarnele anterioare ale măduvei, în special în măduva cervicală și lombară. Aici se întîlnește o hiperemie intensă și un puternic proces inflamator; celulele de infiltrație (limfocite, monocite, plasmocite, polinucleare, celule microglice) se întîlnesc dispuse în special sub forma de noduli inflamatori și manșoane perivasculare.

Neuronii reprezintă elementele cele mai lezate (degenerescențe diferite, de intensitate variabilă, ajungînd adesea la dispariție prin focare de neuronofagie). De altfel, nodulii neuronofagici și postneuronofagici sînt extrem de frecvenți și reprezintă unul din cele mai importante criterii de diagnostic histopatologic. Unii autori au putut pune în evidență incluzii intranucleare în neuronii și gliocitele din măduvă (Sabin, C. Ionescu-Mihăești etc.).

Originea și semnificația acestor formațiuni sînt încă discutate.

Concluzii

Laboratorul de inframicrobiologie poate contribui în largă măsură la diagnosticul poliomielitei umane.

În faza incipientă a bolii, diagnosticul va fi stabilit prin izolarea virusului din sînge, lichid de spălătură nazofaringiană, dar mai ales din fecale, în culturi de celule (embrionare umane, renale simiene, HeLa etc.).

După izolare, virusul va fi identificat și tipat cu ajutorul probei de neutralizare cu seruri imune, standard.

Date utile se pot obține și cu ajutorul unor metode serologice (reacția de fixare a complementului și reacția de seroneutralizare).

Faptul că anticorpii neutralizanți se întîlnesc într-o mare proporție la persoane fără trecut poliomielitic aparent, datorită imunizărilor oculte, reduce mult valoarea testului de seroneutralizare în scop diagnostic; creșterea semnificativă a titrului acestor anticorpi în cursul bolii reprezintă totuși un criteriu util pentru diagnostic.

Dispariția rapidă a anticorpilor fixatori de complement, la 4—8 săptămîni după boală, dă reacției de fixare a complementului o mai mare valoare pentru diagnostic.

În cazurile letale, pe lîngă încercările de izolare a virusului din produse patologice, date importante pentru diagnostic furnizează examenul histopatologic, în special al fragmentelor de măduvă cervicală și lombară. La aceste niveluri, leziunile cele mai importante se întîlnesc în substanța cenușie, fiind caracterizate prin procese inflamatorii intense, cu prezență de neuronofagii și noduli postneuronofagici.

DIAGNOSTICUL INFECȚIILOR *COXSACKIE*

Începînd din 1948, cînd Dalldorf și Sickles au izolat din fecalele unui bolnav de paralizie infantilă un virus patogen pentru șoarecele nou-născut, virusuri asemănătoare, denumite virusuri *Coxsackie*, au fost identificate într-un ritm deosebit în mai toate țările globului, dovedind larga lor răspîndire.

Cercetările efectuate au izbutit să precizeze cadrul infecțiilor cu virusuri *Coxsackie*, infecții cu aspect clinic polimorf (herpangine, mialgii epidemice, pleurodinii, „gripe'' de vară, meningite cu lichid clar, sindroame poliomielitice fruste, benigne etc.), și să situeze germenii cauzali în grupul enterovirusurilor, alături de virusurile poliomielitice, de cele E.C.H.O. și de virusurile Karaganda.

Pluralitatea aspectelor clinice, răspîndirea largă a virusurilor *Coxsackie*, numeroasele forme inaparente ce ocazionează așa-zișii „purtători de virus'', numărul mare de tipuri antigenice descrise (peste 30) subliniază rolul cu totul important pe care îl are laboratorul în stabilirea diagnosticului.

Diagnosticul de laborator al acestor afecțiuni se bazează pe izolarea virusului și pe unele probe serologice.

Izolarea virusului pe animale sensibile

Deși virusul se poate găsi și în spută, exsudat amigdalian, sînge, urină, mai rar în lichidul cefalorahidian, produsul infecțios curent folosit pentru izolarea virusului este constituit din materiile fecale, produsul cel mai bogat în virus, element explicabil prin „enterotropismul" deosebit al acestor inframicrobi.

Pentru inocularea la animalele sensibile (șoarece nou-născut, hamster nou-născut și după unii autori, merionul adult), materiile fecale se suspendă în ser fiziologic sau în soluție Hanks, realizîndu-se o diluție de 1/10. Suspensia se centrifughează 15 minute la 3 000 turații/min., iar lichidul supernatant este folosit pentru inoculare la 30 de minute după adaosul de penicilină și streptomicină (1 000 u. penicilină și 200µg streptomicină pentru fiecare ml suspensie).

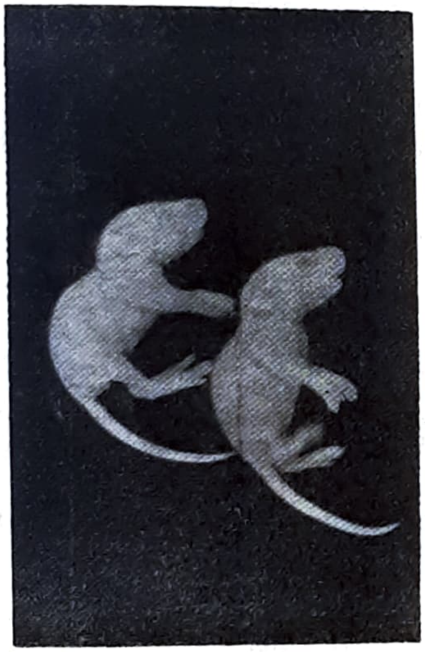


Fig. 542. – Paralizii produse la șoareci nou-născuți de virusul *Coxsackie* A_4: 4 zile după inocularea subcutanată.

Cînd inocularea nu se poate face imediat după recoltare, materiile fecale se conservă la gheţar, de preferință în congelator, unde își mențin valabilitatea timp foarte îndelungat.

Inocularea la șoarecele pui se face pe cale subcutanată, în regiunea dintre omoplați; fiecare animal va primi 0,05 ml din suspensia virulentă. Inocularea se poate face însă cu bune rezultate și pe cale peritoneală, musculară sau chiar cerebrală.

Dat fiind că șoriceii infectați trebuie să fie alimentați de o șoricioaică-mamă se procedează astfel :

Se pun la un loc șoriceii născuți de cîteva mame, se aleg și se repartizează în grupuri de 4–5 animale, fără a ține seama de proveniența lor; fiecare din lotul astfel constituit se inoculează și se repartizează la cîte o șoricioaică-mamă.

În acest fel s-a realizat inocularea fiecărui produs la un grup de șoareci cu receptivitate inegală la eventualul virus, fapt ce crește șansele de izolare [1].

Dată fiind greutatea obținerii constante a unui număr mare de șoareci nou-născuți, în practica curentă se folosește inocularea șoriceilor cu un amestec de fecale provenite de la 4 bolnavi suspecți. În acest scop se amestecă mici fragmente de fecale, avînd însă grija de a păstra fiecare probă în parte în congelator astfel încît, în cazul izolării virusului, să se poată apoi, prin inoculări individuale, identifica bolnavul sau bolnavii de la care a provenit produsul virulent.

La animalele inoculate, primele semne de boală apar între 2 și 10 zile de la infectare. Aceasta se caracterizează cel mai des prin paralizia membrelor posterioare, uneori și a celor anterioare (fig. 542). Alteori, animalele prezintă o stare spastică, cu tremurături ale capului și membrelor, sau ataxie.

După apariția simptomelor este bine ca puii să fie separați de mamă, care, uneori, îi poate devora.

La 12–24 de ore de la apariția acestor simptome, șoriceii mor. Din această cauză este indicată sacrificarea a 1/2 din animalele bolnave imediat după apariția simptomelor morbide. Trecerile următoare se fac cu suspensii obținute prin triturarea întregului animal, după eliminarea pielii și a viscerelor. Adaosul de antibiotice la suspensia virulentă este obligatoriu.

Pentru treceri ulterioare, carcasele se mențin în glicerină tamponată la temperatura ghețarului obișnuit (+4°) sau, de preferință, în ser fiziologic, la – 30°.

Examenul microscopic al secțiunilor șoriceilor morți în urma infecției cu virus *Coxsackie* evidenţiază leziuni interesante, care au permis gruparea tulpinilor de virus *Coxsackie* în două grupuri : grupul A = tulpini cu afinitate exclusivă pentru muşchi şi grupul B = tulpini cu afinitate pentru sistemul nervos central cu sau fără leziuni musculare.

---

[1] Se știe că șoricioaica-mamă care a alăptat șoricei inoculați cu virus *Coxsackie* va da naștere la pui rezistenți față de acest inframicrob, probabil printr-un mecanism de imunizare ocultă a ei și transmitere de anticorpi atît transplacentar, cît și prin lapte.

La necropsia animalelor moarte în urma bolii experimentale cu virus de tip A, aspectul muşchilor este repede recunoscut : ei apar palizi şi gelatinoşi ; la examenul microscopic (fig.543) se constată un aspect de miozită caracteristică, puternică infiltraţie interstiţială cu mononucleare, uneori cu modificarea arhitectonicii musculare. Unele fibre musculare prezintă o dispariţie aproape totală a miofibrilelor, fiind transformate în mase globuloase cu afinitate pentru substanţele colorante acide.

Intensitatea leziunilor musculare diferă de la o tulpină la alta : unele produc leziuni reduse, altele leziuni grave care adesea interesează şi miocardul.

Uneori, datorită distrugerii musculaturii abdominale, se poate constata o herniere a organelor intraabdominale.

Aspectul descris mai sus este cel mai des întîlnit. El caracterizează virusurile *Coxsackie* din grupul A.

Există însă şi tulpini (grupul B) care, la animalul de experienţă produc leziuni ce predomină la nivelul sistemului nervos central (leziuni inflamatorii, mai mult sau mai puţin intense, la nivelul scoarţei, care interesează atît neuronii, cît şi gliocitele). Datorită unor distrugeri masive de ţesut neuronal, se poate constata şi existenţa unor cavităţi neregulate (mai des la şoarecii inoculaţi intracerebral).

Virusurile de tip B pot sau nu să producă şi leziuni de miozită. Ele nu ating însă de obicei intensitatea celor întîlnite la animalele infectate cu virusuri *Coxsackie* de tip A. Dar, în afară de leziunile musculare şi cele nervoase, unele tulpini produc leziuni şi în alte organe şi ţesuturi (pancreas, ficat, plămîn, ţesut adipos). Astfel, la nivelul pancreasului, se constată leziuni de pancreatită difuză ; la nivelul ficatului leziuni de hepatită, uneori cu degenerescenţă grasă ; la nivelul plămînului zone de atelectazie şi de emfizem (fără exsudat alveolar) ; în ceea ce priveşte ţesutul adipos, microscopul evidenţiază leziuni ale celulelor grase, aspecte de edem şi infiltraţie cu polinucleare şi histiocite, mai rar impregnări calcare ale unor focare de necroză.

Deşi boala este transmisibilă direct numai la şoarecele pui (24—48 de ore), trebuie semnalat faptul că unele tulpini ($B_{1,3,4}$) inoculate la şoarecele adult produc frecvent leziuni pancreatice, evidenţiabile cu ajutorul coloraţiei vitale cu albastru de tripan 0,5‰, administrat intraperitoneal la 4 zile de la inocularea virusului pe cale peritoneală (Howes). Trebuie, de asemenea, precizat că administrarea cortizonului (Kilbourne şi colab.) ca şi radiaţiile ionizante (Cajal şi colab.) pot creşte sensibilitatea şoarecelui adult la activitatea patogenă a virusurilor *Coxsackie.*

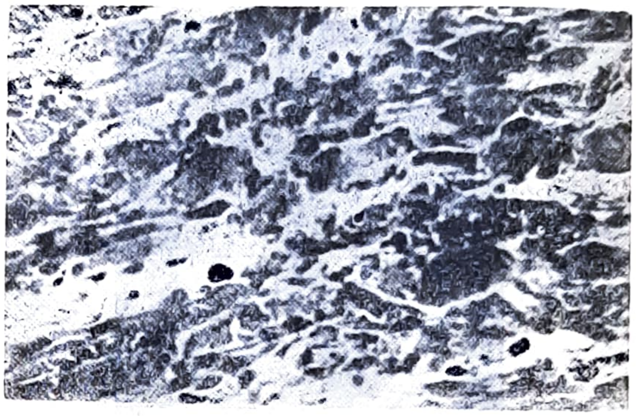


Fig. 543. — Secţiune de muşchi provenită de la un şoarece nou-născut inoculat cu virusul *Coxsackie* A_4 (coloraţie Mann).

Izolarea în culturi celulare

Posibilitatea dezvoltării unor tulpini de virus *Coxsackie* în culturi celulare (celule renale de maimuţă, celule amniotice umane, celule HeLa) a dat speranţa înlocuirii şoarecelui pui în tehnica de lucru curentă a acestor virusuri. Dat fiind însă că din numeroasele tipuri antigenice cunoscute pînă astăzi numai un foarte mic număr pot fi astfel cultivate (tipurile $A_{9,11,13,15,18}$ şi $B_{1,2,3,4,5,6}$), izolarea virusurilor *Coxsackie* în culturi celulare nu poate fi folosită în practica uzuală, cel puţin pînă la găsirea unor celule sensibile pentru toate tipurile.

De altfel, nici tipurile cultivabile în culturi de celule *in vitro* nu se comportă omogen faţă de diferite tipuri de celule (vezi tabelul 174 prelucrat după Dalldorf, Melnick şi Carven).

Existenţa a numeroşi purtători şi excretori „ sănătoşi'' de virus *Coxsackie* face ca diagnosticul de certitudine să nu se poată pune numai pe baza izolării virusului din fecale; este necesar şi un examen serologic paralel.

Creşterea titrului anticorpilor serici în decursul bolii certifică diagnosticul.

Metode serologice

Dintre probele serologice folosite în cadrul infecţiilor cu virusuri *Coxasckie* (reacţia de fixare a complementului, testul de seroneutralizare), cele mai satisfăcătoare rezultate pentru diagnostic se obţin cu ajutorul reacţiei de fixare a complementului.

Reacţia de fixare a complementului. Anticorpii fixatori de complement apar în sîngele bolnavului între a 3-a şi a 8-a zi de boală şi prezintă un titru maxim la 3 săptămîni de la debutul bolii.

Datorită faptului experimental că infecţia cu un tip de virus C (se cunosc pînă astăzi 30 de tipuri antigenice diferite) declanşează apariţia anticorpilor fixatori de complement şi pentru celelalte tipuri (reacţia de grup), în practica uzuală se folosesc antigene preparate din tulpinile cele mai reprezentative, de preferinţă din cele autohtone.

Pentru prepararea antigenului, s-au recomandat numeroase tehnici şi metode; dintre acestea, preferăm pe cea preconizată de Pinter şi Balász.

Şoarecii pui, inoculaţi pe cale subcutanată cu o tulpină de virus C, sînt sacrificaţi la 48–72 de ore. După îndepărtarea capului, pielii şi viscerelor, carcasa este triturată şi omogenizată (de preferinţă într-un aparat de tip Turmix) în 4 volume de ser fiziologic (în lipsa omogenizatorului se va folosi un mojar în prealabil răcit). Suspensia obţinută se centrifughează 10 minute la 3 000 turaţii/min., se recoltează lichidul supernatant şi se supune de 4–5 ori îngheţului şi dezgheţului succesiv.

TABELUL 174

Virusul Coxsackie		Citopatogenitate		
Grupul	Tip	Rinichi de maimuţă	HeLa	Amnios
A	9	+	–	+
	11	–	+	+
	13	–	+	+
	15	–	+	+
	18	–	+	+
B	1	+	+	+
	2	+	±	–
	3	+	+	+
	4	+	±	–
	5	+	+	+
	6	+	+	+

Se centrifughează 30 de minute la 10 000 turaţii/min. şi lichidul supernatant recoltat reprezintă antigenul pentru reacţia de fixare a complementului.

În încercări limitate am obţinut rezultate satisfăcătoare cu antigenele preparate din mediul de menţinere recoltat din culturile de celule HeLa inoculate cu virusuri *Coxsackie* A_{13} şi B_1. Serurile imune se prepară pe şoareci sau pe cobai. Problema obţinerii de seruri standard este însă complicată, datorită numărului mare de tipuri antigenice cunoscute. Pe şoarece serurile se obţin comod după o tehnică recomandată de M. Pinter:

Şoarecii adulţi sînt inoculaţi intraperitoneal la 4 zile interval cu 0,5 ml din suspensia virulentă (triturat de mucoasă de şoarece pui, inoculat experimental şi sacrificat în plină paralizie) diluată 1/5. Se fac în total 5 inoculări. La 7 zile de la inoculare animalele sînt sîngerate. Serul obţinut este inactivat 30 de minute la 56° şi apoi conservat la gheţar.

Pe cobai serul se prepară astfel:

1. Se inoculează intramuscular 5 ml din suspensia virulentă 1/10, cu adaos de adjuvanţi (Bayol, Arlacel).
2. La 5 zile de la prima inoculare se introduc 2 ml suspensie virulentă intradermic (puncte multiple). Se repetă aceasta timp de 4 ori la 5 zile interval.
3. La 10 zile de la ultima inoculare intradermică se introduce intraperitoneal 1 ml suspensie.
4. La 10 zile, sîngerare totală.

Tehnica reacţiei de fixare a complementului se face după indicaţiile recomandate, de preferinţă la rece, pe plăci, pentru economie de antigene şi seruri.

Diluţiile de ser folosite vor fi de 1/2, 1/8, 1/32 şi de 1/128. În reacţie se introduce obligatoriu şi un martor de antigen normal (preparat în condiţii identice din animale neinoculate).

Datorită faptului că anticorpii fixatori de complement, cu titrul maxim la 3 săptămîni de la inoculare, scad treptat, dar se menţin în limitele superioare normalului pînă la 3 ani de la îmbolnăvire, reacţia de fixare a complementului poate fi folosită cu bune rezultate şi retrospectiv.

Reacţia de seroneutralizare. Se foloseşte aproape exclusiv pentru identificarea unui virus izolat.

În practică se utilizează serurile imune preparate pe şoarece sau cobai, iar reacţia se execută după tehnica obişnuită.

Testul se execută în mod obişnuit pe şoareci de lapte. Pentru economisirea şoarecilor pui, uneori greu de procurat, mai ales în cazul reacţiilor de tipizare, cînd este nevoie de un număr atît de mare de animale, recomandăm ca iniţial să se încerce cultivabilitatea virusului izolat în culturi de celule. În cazul unui rezultat pozitiv, testul de neutralizare se va face pe culturi de celule şi numai cu serurile ce corespund tipurilor antigenice astfel cultivabile $A_{9, 11, 13, 15, 18}$ B_{1-6}).

În caz că virusul nu cultivă în celule *in vitro*, seroneutralizarea va fi făcută pe şoareci pui.

Pentru economia de animale, se recomandă folosirea unui amestec de seruri. Astfel pentru virusurile de grup B, ca şi pentru virusurile 11—25 grup A, serurile se folosesc individual; serurile imune faţă de celelalte tipuri de virus A se folosesc combinate după schema: 1, 4, 6, 7 şi 9 sau 2, 3, 5, 8 şi 10. Pentru evitarea contaminărilor accidentale în laboratoare, în decursul experimentării cu virusuri *Coxsackie* se recomandă precauţii suplimentare (mască, ochelari de protecţie etc.).

Concluzii

Diagnosticul îmbolnăvirilor prin virusuri *Coxsackie* se stabileşte prin izolarea virusului din materiile fecale pe şoarecele nou-născut. Aceasta este posibilă în faza acută a bolii şi în special în perioada de debut. În lipsa şoarecilor pui, fecalele pot fi păstrate la congelator timp îndelungat; pentru economie de animale se poate face inocularea cu amestecul a 3—5 probe de fecale; în cazul unui rezultat pozitiv se vor face noi inoculări, separat cu fiecare probă de fecale conservate la congelator. Identificarea tipului de virus se face cu ajutorul reacţiei de neutralizare cu seruri imune, standard, preparate în laborator.

Pentru precizarea diagnosticului într-o fază mai tardivă sau în convalescenţă se foloseşte reacţia de fixare a complementului studiată în dinamică în prezenţa antigenelor preparate din tulpinile cele mai reprezentative, de preferinţă autohtone.

DIAGNOSTICUL INFECŢIILOR PRODUSE DE VIRUSURI E.C.H.O.

Sub denumirea de virusuri E.C.H.O., virusuri enterice citopatogene umane orfane, denumire acordată în 1955 de un comitet de experţi convocat special, se cuprind astăzi un număr însemnat de virusuri (peste 28 de tipuri antigenice), capabile să infecteze tractul intestinal al omului şi să se lase izolate şi cultivate (cel puţin pînă astăzi), exclusiv în culturi celulare[1]. Descoperirea grupului de virusuri E.C.H.O. se datoreşte în mare parte lui Joseph Melnick şi Albert Sabin, care, în afară de izolarea primelor tulpini, au studiat sub unele aspecte cea mai mare parte a componenţilor acestui grup. Recent, la propunerea lui Sabin, tipul E.C.H.O. — 10 a trecut cap de serie într-un nou grup de virusuri enterice şi respiratorii: grupul R.E.O. (respiratorii enterice orfane). De asemenea, virusuri asemănătoare care au fost identificate la diferite specii animale au format grupuri aparte (E.C.M.O., patogene pentru maimuţe; E.C.S.O., pentru porcine, E.C.B.O., pentru bovine etc.).

Cît priveşte grupul de virusuri E.C.H.O., el conţine numeroase tulpini şi tipuri de virusuri ce determină la om „meningite aseptice'', cu sau fără exantem (tipurile 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 14, 16, 21 şi cu siguranţă şi altele), boli febrile cu sau fără exantem (tipurile 9, 16 şi probabil şi altele), paralizii uşoare (tipurile 6 şi 9), encefalite (tipul 9), afecţiuni gastrointestinale, diaree de vară ale copiilor (tipurile 4, 12, 18, 19, 22, 23, 24 şi probabil şi altele), afecţiuni respiratorii (tipul 10) etc.

Trebuie cunoscut, de asemenea, că aproape toate tipurile au fost izolate şi de la indivizi în aparenţă sănătoşi, dovedind larga răspîndire a formelor de boală inaparentă clinic.

Răspîndirea largă a acestor virusuri face ca diagnosticul de laborator să prezinte adesea dificultăţi; cu toate acestea însă fără laboratorul de specialitate diagnosticul este practic imposibil.

Diagnosticul unei infecţii produse de virusuri ce aparţin grupului E.C.H.O. se poate stabili în mod curent prin izolarea virusului din produse patologice (fecale, spălături nazofaringiene, extrem de rar din lichidul cefalorahidian şi cu totul excepţional din sînge) şi mai greu prin metode serologice.

În mod obişnuit, însă, în practica uzuală, izolarea şi identificarea virusului constituie metoda de elecţie.

---

[1] Unele tulpini aparţinînd tipului serologic 9 sînt capabile, în anumite condiţii, să infecteze şoarecele nou-născut.

Izolarea virusului

Produsele patologice utilizate se pregătesc după tehnicile folosite curent și pentru celelalte enterovirusuri (vezi „Poliomielita").

Celulele sensibile sînt în primul rînd cele renale de maimuță și celulele embrionare umane. Slaba sensibilitatea a celulelor HeLa sau a celor de tip Detroit-6 pentru unele tipuri de virusuri E.C.H.O. constituie în anumite ocazii un avantaj, favorizînd diagnosticul diferențial, în special cu virusurile poliomielitice.

Mediile nutritive și tehnica de inoculare sînt aceleași ca cele folosite în cazul virusurilor poliomielitice.

Rezultate. Efectul citopatic produs de virusurile E.C.H.O. este, în general, aproape identic cu cel determinat de virusurile poliomielitice. Trebuie cunoscut însă că, deși multe tulpini E.C.H.O. determină un efect citopatic destul de repede (egal sau ceva mai lent ca poliovirusurile), există și tulpini care cresc mai lent (7—10—14 zile), ceea ce obligă urmărirea atentă microscopică a culturilor și eventuala schimbare a mediului de menținere, la 7 zile.

Mai trebuie, de asemenea, cunoscut că deși cele mai multe tulpini produc inițial o leziune în focar, urmată de distrugerea rapidă a întregii culturi de celule, există și tulpini care, spre deosebire de virusurile poliomielitice, dau distrugeri limitate sau o generalizare lentă a modificărilor citopatice.

Un agent citopatogen izolat trebuie în mod normal tipizat. Pentru aceasta este necesară, în primul rînd, eliminarea unei posibilități de confuzie cu alte enterovirusuri (poliomielită, unele tulpini de virus *Coxsackie*).

În practică identificarea virusului izolat se face cu ajutorul reacției de seroneutralizare.

Numărul mare de tipuri serologice transformă însă această probă într-o metodă laborioasă și dificilă, extrem de pretențioasă. S-au propus diferite simplificări ale metodei, dar care din păcate nu au redus decît în parte numărul operațiilor, fără a izbuti să scurteze timpul necesar precizării diagnosticului.

O oarecare simplificare considerăm că poate fi obținută prin folosirea calității hemaglutinante pe care o au unele tipuri aparținînd acestui grup. Într-adevăr, tulpini aparținînd tipurilor 3, 6, 7, 10, 11, 12 și 19 s-au dovedit capabile să aglutineze hematiile umane de grup O. Trebuie atrasă însă atenția asupra faptului că chiar în cadrul aceluiași tip serologic, există tulpini care se comportă diferit în ceea ce privește testul hemaglutinării.

În consecință, credem că un agent citopatogen izolat va trebui în primul rînd încercat ca antigen în reacția de hemaglutinare. Un rezultat negativ obligă efectuarea unei seroneutralizări, în primul rînd cu un amestec de seruri antipoliomielitice (tip I, II și III), cu seruri anti-*Coxsackie*, preparate cu tipuri cultivabile în culturi celulare (tip $A_0^{*}+B_1+B_2$ sau $B_3+B_4+B_5+B_6$) și apoi cu amestecuri de seruri anti-E.C.H.O. Tehnici simplificate de neutralizare cu amestecuri de seruri anti-E.C.H.O. au fost recent produse de Lim și Benyesh-Melnick, de Schmidt și colab.

Acești autori recomandă pentru tipizarea virusurilor E.C.H.O. distribuirea amestecurilor de ser după anumite scheme, astfel ca fiecare ser să fie inclus în 1, 2 sau mai multe amestecuri. Prin această metodă se ușurează mult identificarea enterovirusurilor care necesită un număr atît de mare de seruri.

Redăm mai jos una din schemele utilizate de Lim și Benyesh-Melnick, în care în 4 amestecuri, sînt distribuite 14 seruri tip (tabelul 175).

Observăm că prin distribuția serurilor în amestec putem stabili de la prima neutralizare tipul de virus. Astfel, serul 1 este cuprins numai în amestecul A, serul 6 în amestecurile B și C, serul 12 în amestecurile B, C, și D și așa mai departe.

TABELUL 175

Tip ser	Cl. I						Cl. II			Cl. III				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Amestec A	×				×			×	×		×		×	×
Amestec B		×			×	×				×	×	×		×
Amestec C			×			×	×		×		×	×	×	
Amestec D				×			×	×		×		×	×	×
	A	B	C	D	AB	BC	CD	AD	AC	BD	ABC	BCD	ACD	ABD

---

* Sau: 11, 13, 15, 18.

Dacă virusul testat față de cele 4 amestecuri dă un rezultat pozitiv numai cu amestecul A, va fi identificat ca tip 1, dacă va da rezultate pozitive cu amestecurile B și C, va fi identificat ca tip 6 și așa mai departe.

Valoarea diagnostică a acestei scheme depinde de omogenitatea virusului testat : cînd virusul conține fracțiuni comune mai multor tipuri, rezultatele sînt neconcludente.

Cînd dorim să utilizăm mai mult de 14 tipuri într-o schemă, trebuie crescut numărul amestecurilor. Iată spre exemplu o schemă pentru 30 de tipuri cuprinse în 5 amestecuri (vezi tabelul 177). Bineînțeles că cu cît crește numărul de seruri, fiecare ser va fi diluat mai mult cu celelalte seruri din amestec. De aci necesitatea de a utiliza în această metodă seruri cu potențial mare, care să permită diluarea, fără a compromite rezultatul.

Același considerent, pentru schema propusă de Schmidt, Guenther și Lennette, ce poate duce la identificarea a 25 de tipuri de virusuri. Schema obligă folosirea a 10 amestecuri de seruri, fiecare amestec cuprinzînd 5 seruri specifice de tip. Deoarece fiecare tip de ser se găsește în 2 amestecuri, rezultatele pot fi ușor apreciate (vezi tabelul 176).

TABELUL 176

Amestec ser nr.	VI	VII	VIII	IX	X
I	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5
II	S_6	S_7	S_8	S_9	S_{10}
III	S_{11}	S_{12}	S_{13}	S_{14}	S_{15}
IV	S_{16}	S_{17}	S_{18}	S_{19}	S_{20}
V	S_{21}	S_{22}	S_{23}	S_{24}	S_{25}

Spre exemplu cînd un agent citopatogen a fost neutralizat de amestecurile I și VIII va putea fi indentificat ca omolog serului 3, cînd neutralizarea a fost realizată de amestecurile I și X, se va preciza corespondența agentului izolat cu serul 5 și așa mai departe.

Schema produsă de Schmidt și colab. poate folosi și 12 amestecuri; în acest caz se pot tipiza 36 de virusuri.

Independent însă de aceste scheme, cînd numărul mare de seruri tip îngreunează testarea individuală, se poate lucra cu amestecuri de seruri. După obținerea unui rezultat pozitiv cu unul din amestecuri, se poate trece, pentru identificarea virusului, la testarea separată cu fiecare ser din amestecul pozitiv.

Metode serologice

Dintre metodele serologice cunoscute, în infecțiile E.C.H.O. se folosesc reacția de neutralizare, mai rar reacția de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare și reacția de fixare a complementului.

Reacția de seroneutralizare este curent utilizată pentru identificarea unui virus izolat; nu se folosește pentru decelarea anticorpilor din serul unui bolnav decît cu totul excepțional (controlul serologic al corespondenței anticorpilor cu tipul virusului izolat, testarea unui ser imun), dat fiind numărul mare de antigene tip cu care practic ar trebui lucrat.

Ca *antigen* se folosește mediul nutritiv recoltat din tuburile de cultură infectate, în momentul unui evident efect citopatic, centrifugat 10 minute la 3 000 turații/min., pentru debarasarea de celule și resturi celulare.

Serurile imune se prepară pe iepure, pentru fiecare tip de virus în parte.

Schema de imunizare folosită de noi cu bune rezultate este cea propusă de M. K. Voroșilova :

5 inoculări la 7 zile interval, din care prima și a 4-a cu 1 ml suspensie virulentă, subcutanat, și 5 ml, intravenos, iar a 2-a, a 3-a și a 5-a cu cîte 1 ml , intravenos. Sîngerarea, la 7 zile de la ultima încărcare.

Dată fiind necesitatea unor seruri cu titruri ridicate (mai ales atunci cînd se folosesc amestecuri de tip diferit), serurile vor fi titrate individual; se vor suma numai cele cu titruri înalte.

Tehnica reacției este cea recomandată.

Pentru simplificarea lucrului se vor folosi combinațiile de seruri, așa cum de altfel am semnalat mai sus.

Reacția de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare. Calitatea aglutinantă a unor tipuri de virusuri E.C.H.O. față de hematiile de om, grup O, este folosită fie pentru simplificarea operației de tipizare a unui virus izolat, fie pentru unele studii epidemiologice (studiul incidenței anticorpilor și deci al unor infecții cu tipul de virus E.C.H.O. hemaglutinant respectiv, într-o populație oarecare).

Ca antigen, se folosesc diluțiile făcute după tehnica uzuală din mediile nutritive recoltate din tuburile de cultură care prezintă un efect citopatic caracteristic.

Suspensia de hematii se face 1% în lichidul diluant (de preferință tampon veronal).

Tehnica reacţiei este în general cea curentă, cu folosirea însă a unor modificări în cantitatea reagenilor (0,4 ml antigen + 0,1 ml suspensie hematii). Citirea se face după 90 de minute.

Rezultate. Aspectul hemaglutinării este asemănător cu cel produs de virusurile gripale şi a fost întîlnit la tulpini aparţinînd tipurilor serologice 3, 6, 7, 10, 11, 12 şi 19.

Concluzii

Diagnosticul unei infecţii produse de un virus din grupul E.C.H.O. se va baza în primul rînd pe izolarea germenului cauzal.

Izolarea se face exclusiv în culturi celulare (embrion uman, rinichi de maimuţă, etc).

TABELUL 177

Ser tip	Cl I					Cl II										Cl.III										Cl IV				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	20	30
Amestecuri :																														
A	×					×				×	×			×		×			×	×	×		×		×	×		×	×	×
B		×				×	×					×			×	×	×			×	×	×		×		×	×		×	×
C			×				×	×			×		×			×	×	×				×	×		×	×	×	×		×
D				×				×	×			×		×			×	×	×		×		×	×		×	×	×	×	
E					×				×	×			×		×			×	×	×		×		×	×		×	×	×	×

Reacţia de inhibare a hemaglutinării foloseşte 4 unităţi hemaglutinante şi seruri tip pregătite pe iepure. În reacţie se folosesc diluţiile de ser (0,2 ml) şi antigenul virotic (4 u. HA) în 0,2 ml, în contact 2 ore la temperatura camerei. Hematiile (1%) se adaugă în cantitate de 0,1 ml suspensie pentru fiecare tub. Lectura se face la 90 de minute. Trebuie precizat că în cazurile în care se urmăreşte decelarea anticorpilor hemaglutinoinhibanţi în seruri umane sau animale, este obligatorie îndepărtarea inhibitorilor nespecifici cu periodat de K sau cu caolin.

Reacţia de fixare a complementului este puţin folosită în practica uzuală, dat fiind că, spre deosebire de infecţiile cu adenovirusuri, unde are o specificitate de grup, în infecţiile cu virusuri E.C.H.O. ea are, în general, un caracter de tip. În consecinţă, reacţia nu aduce nici o simplificare, nici în tehnica de tipizare şi nici în cea de diagnostic propriu-zis. Aceasta mai ales pentru faptul că unele tipuri de virus determină şi o creştere a titrului fixator pentru unele tipuri de virusuri poliomielitice, *Coxsackie* şi chiar E.C.H.O şi invers.

Spre exemplu : tipul de virus E.C.H.O.$_6$ (tulpina Zeipel 1957) determină o creştere a anticorpilor faţă de E.C.H.O$_6$ şi faţă de cele 3 virusuri poliomielitice. Tulpina E.C.H.O.$_6$ (Johnsson) determină însă apariţia anticorpilor şi pentru E.C.H.O.$_9$, *Coxsackie* B$_3$ şi B$_4$; tulpina *Coxsackie* A$_5$ determină apariţia de anticorpi faţă de tipul omolog, ca şi pentru E.C.H.O.$_6$ şi $_9$ etc.

Efectul citopatic este asemănător cu cel produs de alte virusuri şi mai ales de cele enterice. Aceasta obligă la identificarea agentului izolat.

Pentru aceasta într-o primă fază se testează calitatea hemaglutinantă a agentului izolat. Un rezultat pozitiv va permite încercarea tipăririi virusului cu seruri imune individuale preparate cu tulpini hemaglutinante.

O reacţie de hemaglutinare negativă obligă practicarea neutralizării cu seruri imune de diferite tipuri E.C.H.O. Se recomandă folosirea amestecurilor de seruri (schema Lim-Melnick sau Schmidt), bineînţeles după eliminarea unei posibilităţi de apartenenţă a virusului izolat la grupul polio sau *Coxsackie.* Pentru precizarea relaţiilor etiologice dintre virusul izolat şi sindromul morbid se recomandă studiul dinamicii anticorpilor neutralizanţi sau hemaglutinoinhibanţi (în cazul unui virus hemaglutinant) din serul bolnavului, faţă de virusul izolat în cultura de celule.

Concluzii generale

Diagnosticul de laborator al unei enteroviroze se va baza, în primul rînd pe izolarea inframicrobului cauzal.

În consecinţă, în faza de debut, produsul patologic (de preferat materiile fecale) va fi inoculat paralel în culturi celulare (embrion uman, rinichi de maimuţă etc.) şi la şoareci nou-născuţi.

Izolarea unui virus patogen pentru şoarecele nou-născut va dirija mijloacele de tipizare în cadrul grupului *Coxsackie*; obţinerea în paralel şi a unui efect citopatic va uşura operaţia de tipare, investigaţiile urmînd a fi făcute în primul rînd în direcţia grupului *Coxsackie* B sau a puţinelor tipuri din grupul A, cultivabile în culturi celulare. Obţinerea exclusivă a unei boli evidente la şoarece va fi urmată de examene microscopice ale sistemului nervos şi ale muşchilor animalului şi apoi, facultativ, de reacţii de neutralizare pe şoareci pui, în vederea precizării tipului de virus *Coxsackie* izolat.

Obţinerea de rezultate negative, pe şoarecele pui şi pozitive pe culturi de celule, va obliga diagnosticul diferenţial între virusurile poliomielitice şi virusurile din grupul E.C.H.O. Seroneutralizările practicate iniţial cu amestecuri antipolio vor putea confirma sau exclude diagnosticul de poliomielită.

Infirmarea diagnosticului de poliomielită va obliga cercetătorul să treacă la o fază următoare: tiparea agentului citopatogen izolat, în vederea încadrării lui în grupul E.C.H.O.

Pentru aceasta se va trece iniţial la precizarea calităţii hemaglutinante a agentului izolat. O reacţie pozitivă va uşura tiparea, care va putea fi făcută iniţial prin reacţia de hemaglutinoinhibare.

O hemaglutinare negativă va fi urmată de reacţii de seroneutralizare în culturi celulare cu amestecuri de seruri, în primul rînd cu acele seruri preparate cu tipurile nehemaglutinante.

Cum există chiar în cadrul aceluiaşi tip de virus E.C.H.O. tulpini hemaglutinante şi nehemaglutinante, se vor efectua în continuare (dacă bineînţeles nu s-au obţinut rezultate concludente) neutralizări şi cu celelalte tipuri de seruri imune.

În faza de debut a unei enteroviroze se va recolta şi sînge venos. Priza de sînge va trebui repetată la 7—10 zile interval. Cu probele de sînge se vor practica R.F.C. cu antigene poliomielitice. Numărul mare de tulpini de virus *Coxsackie* şi E.C.H.O., slabele rezultate obţinute pînă acum cu reacţia de fixare a complementului în aceste enteroviroze nu permit recomandarea extinderii reacţiei. Cît priveşte reacţiile de seroneutralizare şi hemaglutinoinhibare (pentru tipurile hemaglutinante), persistenţa anticorpilor respectivi timp îndelungat face practic nerecomandabile aceste metode pentru diagnosticul curent serologic.

În cazurile letale, pe lîngă încercările de izolare a virusului din produse patologice, date utile diagnosticului furnizează examenul histopatologic, în special al fragmentelor de măduvă lombară şi cervicală. La aceste niveluri se vor găsi, în cazul poliomielitei, leziuni evidente în substanţa cenuşie (procese inflamatorii intense, neuronofagie şi noduli postneuronofagici).

BIBLIOGRAFIE

ADERCA I., CAJAL N. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol* 1958, vol. 9, p. 435.

ADERCA I. — Virusurile E.C.H.O., Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, Bucureşti, 1962, p. 106.

ADERCA I., şi colab. — Culturi de celule în inframicrobiologie, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1963.

CAJAL N. — Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1958.

CAJAL N., ADERCA I., şi colab. — *Microbiologia (Bucureşti)*, 1960, nr. 1, p. 47.

CIUMAKOV M. P., VOROŞILOVA M. K., JEVANDROVA, MIRONOVA, IŢELIS F. G., ROBINSON I. A. — *Vop. Virusol.*, 1956, vol. 1, p. 16.

DANIELESCU G. — Grupul virusurilor *Coxsackie*, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, Bucureşti, 1962, p. 87.

DONA D. şi DONA G. — *Microbiologia, (Bucureşti)*, 1961, nr. 5, p. 387.

GILGENKRANTZ S., Le MOYNE M., LAVERGNE E. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1962, vol. 102, p. 670.

GRUIA M., COPELOVICI Y., ARMAŞU V., LECCA C., VASILESCU V. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1960, vol. 11, p. 579.

GRUIA M., COPELOVICI Y., CIOBĂNESCU M., GROZA-M., DAMIAN M. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1961, nr. 12, p. 203.

IONESCU — MIHĂEŞTI C., HORODNICEANU Fl., SERGIESCU D., KLEIN R. — *Microbiologia (Bucureşti)*, 1959, nr. 1, p. 25.

LERNER M., REMINGTON J. A. MAXWELL F. — *Virology*, 1961, vol. 14, p. 303.

MELNICK J. — Advances in the Study of the Enteroviruses, *Progr. med. Virol.*, 1958, vol. 1, p. 59.

MELNIK J., — *Ann. N. Y. Acad.Sci.*, 1962, vol. 101, p. 237.

MIRONOVA L., GOLDRIN N. a. MAMONENKO L. — *Acta virol.*, 1963, vol. 7, p. 97.

NICOLAU S., RĂDULESCU AL., CONSTANTINESCU N., CAJAL N., MARINESCU GH. — Poliomielita. Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1961.

NICOLAU S. — Poliomielita, Elemente de inframicrobiologie specială, Ed. medicală, Bucureşti, 1962, p. 59.

NICOLAU S., CAJAL N., CEPLEANU M., ADERCA I., CONSTANTINESCU N. M., — *Comunic. Acad. R.P.R.*, 1960, vol. 10, p. 1 157.

PODOPLEKIN V. D. — *Acta virol.*, 1963, vol. 7, p. 131.

SABIN A., SYVERTON J. T., WENNER H. A. — *Virology*, 1962, vol. 16, p. 501.

SCHÄFER E. — *Dtsch. med. Wschr.*, 1962, vol. 87, p. 1 269.

SHAW E., NEWTON A., POWELL A., FRIDAY CH., — *Virology*, 1961, vol. 15, p. 208.

SCHMIDT N. J., DENNIS J., HAGENS S. J., LENNETTE E. — *Amer. J. Hyg.*, 1962, vol. 75, p. 74 și p. 168.

VOROȘILOVA M. K., GOLUBEVA N. N., ROBINSON I. A. — IV — th Internat. Polio. Conf., 1958, p. 414.

ZEITLENOK N. A., NIKOLAIEVSKAIA Z. S. — VI-th Scient. Conf. Inst. Polio. and Viral Encephal., Acad. Med. Sci. U.R.S.S., Moscova, 1961, p. 114.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR EPIDEMICE INFRAMICROBIENE

Printre inframicrobiozele umane care constituie importante probleme de sănătate publică, hepatita epidemică se situează la loc de frunte.

Diagnosticul de laborator al acestei afecțiuni se găsește încă într-o criză importantă, deși la ora actuală există numeroase tulpini de virus izolate în culturi celulare și care par a avea relații etiologice strînse cu această afecțiune (Rightsell și colab. Ananiev și Șubladze, Laszlö și colab., Mitroiu și colab. etc.). Numeroase probe de diagnostic propuse și care au dat speranțe justificate s-au dovedit însă ca avînd o valoare limitată la anumite forme și chiar la anumite perioade epidemice. Această situație se datorește în special existenței unui mare număr de virusuri hepatitice, pluralității virusurilor hepatitice deci, pusă în evidență de Șt. S. Nicolau și colab.

Această pluralitate de virusuri este explicată în bună măsură de către Șt. S. Nicolau și școala sa ca o consecință a unui proces de variabilitate naturală a virusului respectiv.

Deși pentru diagnostic, așa cum am subliniat s-au propus și folosit numeroase metode — hematologice, serologice, histologice, experimentale, alergice și biochimice — astăzi, prin inconstanța valorii celor mai multe din tehnicile descrise, oamenii de laborator se rezumă la unele metode biochimice, care, deși nespecifice, permit un bun diagnostic, valabil pentru moment la toate tipurile de hepatită epidemică inframicrobiană. În consecință, se va discuta diagnosticul de laborator al acestei afecțiuni, care se bazează pe probe biochimice. Dintre acestea nu ne vom referi la testele de explorare hepatică, descrise într-o altă parte a acestui volum, ci exclusiv la determinările unor enzime de cea mai mare importanță — *aldolaza și transaminaza serică*.

Dozarea activității aldolazei serice. Dozarea activității acestui ferment în cursul hepatitelor epidemice a preocupat un mare număr de cercetători, începînd din anul 1954, cînd Fr. Bruns a semnalat că este foarte crescut în serurile hepatitice, în comparație cu serurile normale.

În lucrările făcute în diferite laboratoare, s-a ajuns la concluzia că testul aldolazei reprezintă o foarte bună metodă de laborator pentru diagnosticul precoce al hepatitelor epidemice, chiar și al formelor inaparente clinic.

Metoda se bazează pe reacțiile de culoare pe care le dau triozele fosforice cu 2,4-dinitrofenilhidrazina, în mediul alcalin.

Tehnica reacției propriu-zise este descrisă la capitolul „Biochimie”.

Dozarea activității aldolazei serice a dat satisfacții majorității cercetătorilor care au experimentat-o și aplicat-o. Alături de aceștia, împreună cu colaboratorii din Institutul de inframicrobiologie al Academiei R.P.R., pe baza a peste 2 000 de reacții efectuate la 600 de bolnavi de hepatită epidemică, în diferite faze ale bolii și cu diverse forme clinice, la 1 027 de indivizi sănătoși și la 150 de bolnavi de alte afecțiuni am putut constata valoarea deosebită a metodei atît pentru diagnosticul bolii, pentru precocitatea acestui diagnostic, pentru aprecierea prognosticului, cît și pentru identificarea formelor atipice și chiar a celor inaparente clinic.

Într-adevăr, în timp ce la persoanele sănătoase dozarea activității aldolazei serice arată valori cuprinse între 2,2 și 22 (medie 13,22), la hepatitici se întîlnesc cifre situate între 9,5 și 146 (medie 61,60). Dozată în alte afecțiuni, aldolaza a prezentat constant valori scăzute (medie 20,27) (fig. 544). Astfel, în boli virotice diverse (rujeolă, rubeolă, oreion, mononucleoză infecțioasă etc.), s-a găsit o valoare medie de 21,8, în afecțiuni hepatice diverse (icter mecanic, icter hemolitic, hepatite cronice, colecistite) valorile medii sînt de 22,23, iar în alte afecțiuni (ulcer gastric, hipertensiune arterială reumatism poliarticular acut, amigdalite, neoplasme diverse etc.), s-au găsit cifre cuprinse între 3 și 19 (medie 12,57).

Rezultatele obținute la hepatitici sînt și mai evidente atunci cînd reacția este apreciată în funcție de diferitele perioade ale bolii.

Într-adevăr, în *perioada de incubație*, în stadiul preicteric, dozarea aldolazei a arătat cifre cuprinse între 65,5 și 119,5 (medie 89,2), în primul septenar de boală cifre între 25,5 și 146 (medie 90,20), în cel de-al doilea septenar între 22 și 138 (medie 51,63), în al treilea septenar între 15 și 122 (medie 45,23), iar după 21 de zile valori mai coborîte (medie 33) (fig. 545).

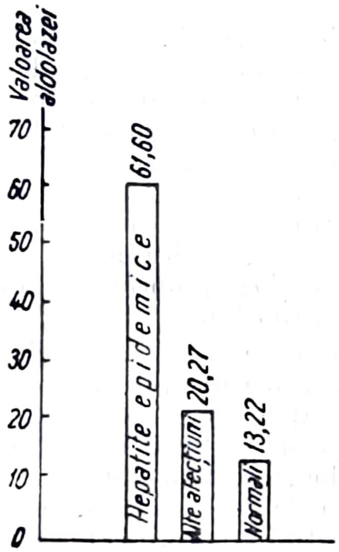


Fig. 544. — Valoarea aldolazei serice la bolnavi de hepatită epidemică, cu alte afecțiuni și la normali.

De remarcat că în primele 2 septenare de boală valorile coborîte (sub 30) sînt foarte rar întîlnite. În mod obișnuit, activitatea aldolazei serice este mult crescută în stadiul preicteric și începutul stadiului icteric (peste 30). Dat fiind însă că, în cursul bolii, aproape fără excepție, cifrele scăzute cresc vizibil, în cazurile cu o valoare aldolazică coborîtă se impune repetarea reacției, studiul său dinamic.

Din datele expuse rezultă deci, existența de valori mari ale activității aldolazei în cursul hepatitei epidemice, în special în primul septenar de boală; trebuie de altfel subliniat că valorile întîlnite și în celelalte faze ale bolii depășesc vizibil pe cele întîlnite în alte afecțiuni sau la normali, iar după 21 de zile, înspre convalescență, valorile activității acestui ferment se apropie de limitele normalului. Trebuie arătat însă că valorile aldolazei se mențin ridicate și după 21 de zile, atunci cînd avem de-a face cu forme grave, prelungite, cu forme complicate.

Astfel, în formele severe, valoarea medie după a 21-a zi este de 87,7 cu limite între 53,8 și 117,5, iar în cele prelungite, cu recrudescență, media întîlnită a fost de 81,7 (fig. 546). S-a dovedit că există un real paralelism între activitatea enzimatică și evoluția bolii și că, în consecință, reacția aldolazei are și o *valoare prognostică*.

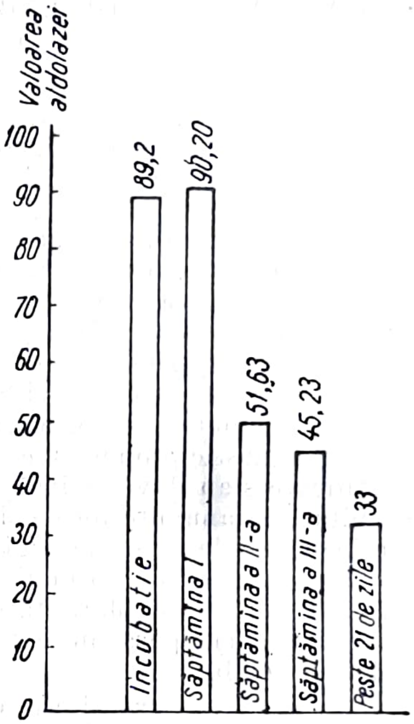


Fig. 545. — Valoarea aldolazei serice la bolnavii de hepatită epidemică în funcție de perioada de boală.

Într-adevăr, în timp ce în formele ușoare sau medii valoarea aldolazei revine relativ repede în limitele normalului, în formele grave, cu recrudescență, în formele complicate, această valoare rămîne crescută, prevestind aceste complicații. Acestea pot fi de altfel anunțate în unele cazuri și printr-o creștere bruscă a valorii aldolazei serice în cursul unei evoluții normale, cu tendință la scădere. Evoluția bolii în astfel de cazuri confirmă sensibilitatea reacției cu atît mai mult, cu cît, în majoritatea unor astfel de cazuri, testele de rutină sînt normale sau la limita normalului.

Cele expuse subliniază valoarea testului aldolazei serice pentru precizarea diagnosticului unei hepatite epidemice. Procentajul crescut de rezultate pozitive al reacţiei în cursul hepatitei virotice (100% în primul septenar, 75,8% în cel de-al doilea, 48,5% în cel de-al treilea), comparativ cu martorii (4,2%), dovedeşte din plin aceasta (fig. 547).

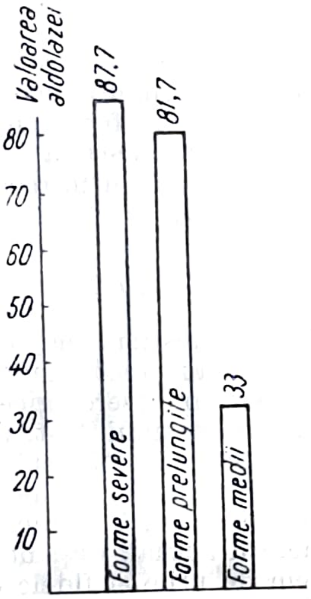


Fig. 546. **— Valoarea aldolazei serice la bolnavii de hepatită, după 21 de zile, în funcţie de forma clinică.**

Dar, după cum am precizat, reacţia are posibilitatea de a stabili diagnosticul, chiar în formele inaparente clinic. În cercetări efectuate de noi în colectivităţi închise, prin repetarea reacţiei de 4—8 ori, la intervale de 4—7 zile, la 170 de contacţi cu bolnavii, am putut să dovedim clar aceasta. Printre aceşti 170 de contacţi aparent sănătoşi, am găsit 15 cu reacţia aldolazei pozitivă.

Urmăriţi în timp, după o perioadă care a variat între 3 şi 14 zile, 2 adulţi au prezentat simptome caracteristice perioadei preicterice, urmate la intervale diferite de simptomul icteric, iar alţi 3 indivizi au prezentat semne subiective foarte uşoare şi o bilirubinemie crescută (18—21 mg$^{0}/_{00}$), traducînd astfel existenţa unor forme discrete, anicterice, ambulatorii, de hepatită epidemică.

Celelalte 10 cazuri, care au arătat iniţial valori crescute ale activităţii aldolazei serice, ne-au permis să conchidem că acest test, extrem de sensibil, poate decela chiar formele inaparente clinic. Într-adevăr, în aceste cazuri, valorile crescute ale aldolazei serice, studiate dinamic, au prezentat curbe cu totul superpozabile celor constatate la bolnavi cu forme icterice de hepatită epidemică (fig. 548). De precizat că, în afara testului aldolazei serice, nici o altă probă

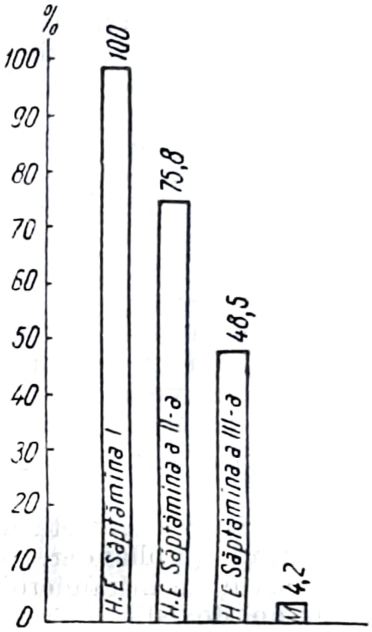


Fig. 547. **— Procentajul reacţiilor pozitive la bolnavii de hepatită şi la martori.**

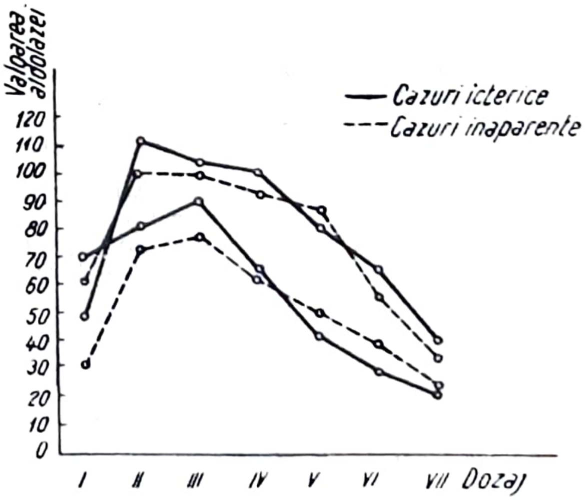


Fig. 548. **— Curba activităţii aldolazei la bolnavii cu forme icterice şi la 2 bolnavi inaparent clinic.**

de laborator şi nici un simptom nu au putut fi puse în evidenţă în aceste cazuri [1].

Dozarea transaminazei serice. În ultimii ani numeroşi cercetători s-au preocupat de investigarea transaminazei serice în afecţiunile hepatice (toxice, virotice etc.), conchizînd că o creştere evidentă a acestei enzime este suficient de semnificativă pentru precizarea unui diagnostic.

Reacţia s-a dovedit extrem de sensibilă, chiar mult mai sensibilă decît cea a aldolazei serice, fapt care generează, în opoziţe cu aceasta din urmă, şi o serie de erori de diagnostic.

Reacţia furnizează date de cea mai mare importanţă, atît pentru diagnosticul formelor tipice cît şi al celor anicterice şi, după unii autori, chiar şi al celor inaparente clinic; hepatitele cronice evolutive beneficiază mult în diagnosticul lor de această probă.

Tehnicile de dozare sînt descrise la capitolul „Biochimie''.

În hepatitele epidemice, cercetările efectuate de numeroşi autori (Mollander, Wroblewski etc., iar în Institutul de inframicrobiologie, de Liu-Chung Pai) au dovedit o creştere remarcabilă a transaminazei glutamic-oxalo-acetice (T.G.O.) în hepatitele epidemice (cifră medie 375 u.), comparativ cu normalii (cifră medie 63,8 u.). Valorile sînt crescute încă din incubaţia bolii, favorizînd deci un diagnostic precoce şi menţinîndu-se ca atare pînă la ameliorarea stării generale a bolnavilor, cînd scad treptat. În general, s-a dovedit că valorile acestei enzime sînt proporţionale cu intensitatea leziunilor hepatice şi cu gravitatea formei clinice (valoare prognostică).

Valori crescute ale transaminazei serice au fost observate, de asemenea, în formele anicterice de boală şi chiar în formele inaparente clinic (Schneider şi Mosley).

Faptul că în hepatitele toxice şi rar şi în alte afecţiuni (colecistită cronică, neoplasm hepatic etc.) se pot întîlni valori foarte mari ale transaminazei serice face ca această reacţie, extrem de sensibilă, să fie mai puţin recomandabilă ca cea a aldolazei serice.

Concluzii

Deşi pentru diagnosticul hepatitei epidemice inframicrobiene s-au recomandat numeroase metode de laborator (serologice, histologice, biologice etc.), lipsa unui test valabil pentru toate tipurile de hepatită epidemică obligă folosirea unor determinări biochimice şi, în special, a dozării activităţii unor enzime, care pînă în momentul actual, deşi nespecifice, s-au dovedit extrem de utile şi fidele diagnosticului precoce şi chiar al formelor inaparente clinic.

Dintre testele curent folosite (aldolazemia, transaminazemia, serotoninuria etc.), recomandăm testul aldolazei serice, test cu o înaltă valoare diagnostică, valoare prognostică şi chiar epidemiologică şi care, printr-o sensibilitate mai mică ca a testului transaminazei serice, fereşte de erori în diagnostic.

BIBLIOGRAFIE

ANANIEV V. A., ŞUBLADZE A. K. — *Vop. Virusol.*, 1959, nr. 3, p. 358; 1961, nr. 5, p. 538.

ANDREESCU M., BABA C. — The works of the Inst. of Inframicrobiol. of the R.P.R. Academy (Abstracts), 1949—1961, p. 85.

ATHANASIU P., ANDREESCU M., IALOMIŢEANU M., — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1961, vol. 12, p. 129.

BALMUŞ G., MITROIU O., LITMAN S., VĂTĂŞESCU A., COFFLER M., — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1958, vol., 9 p. 343.

BRUNS Fr. — *Biochem Z.*, 1954, nr. 156, p. 325.

CAJAL N., MATEESCU S., LISSIEVICI E., — *Comunic. Acad. R.P.R.*, 1951, vol. 1, nr. 8, p. 817.

CAJAL N., BABA C., TUDOR V., — Comunic. Acad. R.P.R., 1958, vol. 8, p. 967.

CAJAL N., BABA C., BOERU V., MITROIU O. — *G. Mal. infett.*, 1960, vol. 12, p. 482.

CAJAL N., BABA C., TUDOR V., BOERU V. — Z. *ges. Hyg.*, 1960, nr. 6, p. 106.

KUBELKA V., SLAVIK H., SPUCHSO O. — *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.*, 1958, nr. 171, p. 401.

LIU-CHUNG PAI — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1960, vol. 11, p. 437.

LASZLO, PETER M., FILEP V., ABRAHAM A., BALINT E., DOMOKOS L., KASZA L., GYORGYI P., BEDÖ A. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1962, vol. 13, p. 313.

MITROIU O., BARBU C., CAJAL N., DEMETRESCU R., IONESCU TH ., POPA M. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1962, vol. 13, p. 319.

MITROIU O., PREDOVICI F., POPA M. — *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1960, nr. 2, p. 149.

NICOLAU S., CAJAL N., MATEESCU S., CEPLEANU M., LISSIEVICI E., COPELOVICI Y. — *Comunic. Acad. R.P.R.*, 1953, vol. 3, p. 3—4, p. 133.

NICOLAU S., CAJAL N. — *Rev. Ştiinţ. med.*, 1956, vol. 1, nr. 2 p. 73.

NICOLAU S., BIBERI-MOROIANU S., CAJAL N. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1959, vol. 10, p. 401.

---

[1] Această ipoteză a fost confirmată şi prin lichidarea focarelor de boală, acolo unde persoanele „sănătoase'' aldolazopozitive au fost izolate, întocmai ca şi ictericii.

NICOLAU S. — *Arch. Mal. Appar. dig.*, 1961, vol. 50, p. 39.

NICOLAU S., CAJAL N. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1961, vol. 12, supl. p. 31.

NICOLAU S., CAJAL N., MITROIU O. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1963, vol. 14, p. 7.

RIGHTSELL W. A., LELTSCH R. A., TEKUSHAN F., MC. LEAN I. W. — *Science*, 1956, vol. 124, p. 226; *J. Amer. med. Ass.*, 1961, nr. 177, p. 671.

SIBLEY J., LEHINGER J. — *J. biol. Chem.*, 1949, nr. 177, p. 859.

TOVARNIŢKI V. I. — *Z. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1955, nr. 10, p. 67.

VERLINDE J. D. u. BOER H. D. — *Arch ges. Virusforsch.*, 1948, nr. 4, p. 1.

DIAGNOSTICUL MONONUCLEOZEI INFECŢIOASE

Pentru diagnosticul mononucleozei infecţioase, atît în formele clinice tipice, cît şi în cele atipice (icterice, digestive, apendiculare, eruptive, meningitice, anginoase etc.), ajutorul laboratorului este extrem de preţios.

Creşterea numărului de cazuri cu această afecţiune, care a determinat paralel şi o creştere a numărului de erori de diagnostic, mononucleoza fiind adesea considerată hepatită epidemică, leucemie, difterie etc., a transformat laboratorul de specialitate într-un factor indispensabil stabilirii unui just diagnostic.

În acest scop, laboratorul se bazează pe examene hematologice, pe probe serologice, histopatologice, pe testul cutanat şi, cu totul excepţional, pe transmiterea experimentală a bolii la maimuţă.

Examenul hematologic. Pentru diagnosticul mononucleozei infecţioase, examenul hematologic urmăreşte în sîngele periferic, cantitativ şi calitativ, elementele din seria albă.

Leucograma practicată în primul septenar de boală arată, de obicei, un număr de 8000—20 000 de leucocite/mm³, cifra maximă găsindu-se la 10—12 zile de la debut. Există însă cazuri cu leucopenie, cazuri cu un numr normal de leucocite, precum şi cazuri cu hiperleucocitoză (50 000—180 000/mm³).

Ceea ce stabileşte însă diagnosticul afecţiunii sînt modificările calitative, care traduc în special atingerea sistemului mieloid, limfoid şi reticulohistiocitar. Ca urmare, în sîngele periferic se constată o hipermononucleoză, element fundamental pentru diagnosticul hematologic.

Trebuie precizat că în această afecţiune nu există un tip celular patognomonic, ci un complex de celule atipice. Într-adevăr, de cele mai multe ori limfocitele şi monocitele rămîn în limitele normale sau cresc uşor, iar apariţia unui număr mare de mononucleare anormale dă frotiului de sînge un aspect polimorf.

Tabloul hematologic este caracterizat prin frecvenţa extraordinară a celulelor zise *limfoidale*, expresie patologică a iritaţiei sistemului limfatic, celule mononucleare cu morfologie variată de trecere de la monocite la plasmocite. În unele cazuri, aceste celule mononucleare pot reprezenta 80—97% din elementele albe întîlnite în sîngele periferic.

Celulele limfoidale au dimensiuni variate (10 — 15 — 20 μ), contur neregulat, de multe ori şters, o citoplasmă intens bazofilă, cu o zonă perinucleară mult mai deschisă şi nuclei bizari, ovalari sau reniformi, cu o structură cromatiniană mai mult sau mai puţin densă şi neregulată; vacuolizarea citoplasmei dă adesea celulelor un aspect spumos, caracteristic.

După H. I. Leitner se disting trei grupe de celule de origine limfatică:

1. *Limfoblaşti*, cu un nucleu palid, cu o structură laxă şi cu 1—2 nucleoli. Citoplasma prezintă o bazofilie de intensitate variată. Aceste celule se întîlnesc în număr redus şi dispar rapid din torentul circulator.

2. *Celule limfocitoide*, asemănătoare cu limfocitele, avînd un nucleu situat excentric, polimorf, mai bogat în cromatină şi cu o structură mai densă. În citoplasmă se întîlnesc granulaţii azurofile.

3. *Monolimfocite* (limfocite monocitoide) — celule mari cu un nucleu lobat sau în potcoavă, sărac în cromatină, asemănător cu nucleul monocitelor şi cu o citoplasmă deschisă, uşor bazofilă, hialină, uneori vacuolară, asemănătoare cu a limfocitelor.

Deosebirea certă de monocite o poate stabili reacţia peroxidazelor, după tehnica Sato-Susuki, negativă în aceste celule. Iată timpii acestei tehnici simple:

1. Frotiurile de sînge perfect uscate, nefixate, sînt introduse pentru 30 de secunde într-o soluţie de sulfat de cupru 10%.

2. Lamele nespălate sînt acoperite pentru 2 minute cu o soluţie de benzidină 0,1%, în care se introduce, în momentul folosirii, apă oxigenată (2 picături la 100 ml).

3. Se îndepărtează soluția de benzidină și, fără să se spele, se acoperă frotiul pentru 2 minute cu o soluție de safranină 1%.

4. Spălare cu apă distilată, uscare, examinare.

Rezultate. Granulațiile peroxidazice apar colorate în albastru. Ele se găsesc în polinucleare și monocite, dar nu în monolimfocite.

După majoritatea autorilor, în faza acută, în formulă domină formele plasmatice, în timp ce limfocitele mari și monolimfocitele sînt mai rare. Paralel cu evoluția bolii, acestea din urmă devin din ce în ce mai numeroase, ca și umbrele celulare de tip Gumprecht.

Eozinofilele și bazofilele lipsesc în stadiul acut al bolii; în convalescență, numărul lor revine la normal, putîndu-se întîlni chiar cifre mult crescute.

După încetarea procesului infecțios, celulele limfoidale se împuținează și tabloul hematologic este dominat de limfocite.

În mod normal, eritropoeza și trombocitopoeza nu prezintă modificări în cursul mononucleozei infecțioase. Există totuși rare cazuri în special în formele grave, în care se constată anemii hipocromice, anemii hemolitice și trombopenii.

Examenul serologic. Dintre probele serologice propuse pentru diagnosticul mononucleozei infecțioase se folosesc: reacția de aglutinare Hăngănuțiu-Paul-Bunnell-Davidsohn, reacția de hemoliză și reacția de hemaglutinare pasivă. Diagnosticul curent se bazează însă pe reacția Hăngănuțiu-Paul-Bunnell-Davidsohn (H.P.B.D.).

Într-adevăr, deși s-au găsit reacții H.P.B.D. pozitive în foarte rare cazuri și în alte afecțiuni, reacția de hemaglutinare H.P.B.D. poate fi considerată ca unul dintre cele mai bune mijloace de diagnostic al mononucleozei infecțioase, fiind pozitivă în aproximativ 70% din cazuri, la titruri superioare de 1/32.

Reacția este pozitivă încă din primele zile ale bolii, sfîrșitul primului septenar reprezentînd momentul cel mai propice pentru recoltarea serului. O excepție face forma anginoasă, în care reacția devine pozitivă de obicei în al doilea septenar, de cele mai multe ori în faza de declin al bolii.

Hemaglutininele dispar în medie la 80 de zile de la vindecarea afecțiunii. Există însă cazuri în care dispariția lor se face rapid, la 14 zile, precum și cazuri în care durata reacțiilor pozitive depășește 300 de zile.

Nu există paralelism între titrul reacțiilor pozitive și gravitatea bolii.

În ce privește interpretarea rezultatelor, trebuie considerate separat rezultatele furnizate de *reacția de prezumție* și cele obținute cu ajutorul testelor complete calitative.

În reacția de prezumție, în cazul unui individ cu simptomatologie tipică și care nu a primit în ultimele 2—3 luni pe cale parenterală ser de cal sau alte proteine heterologe, aglutinarea la un titru de 1/320 sau mai mare reprezintă un criteriu important de diagnostic prezumtiv al mononucleozei infecțioase. De altfel, însă, nici titrurile mici (1/20—1/80) nu elimină diagnosticul. Cu toate acestea se recomandă, în toate cazurile cu testul prezumtiv pozitiv și în special în cazurile cu titruri mici, efectuarea probei calitative, adevărata probă de diagnostic.

În cazul probei calitative, adsorbția totală pe extractul de hematii de bou și lipsa de adsorbție pe extractul de rinichi de cobai stabilesc pozitivitatea reacției, chiar și pentru titruri joase.

Astfel chiar, o reacție slabă (1/20 în seria A și C și negativă în seria B) poate fi considerată pozitivă; o astfel de reacție s-ar scrie astfel:

Seria A	Seria B	Seria C
432 000 000	000 000 000	432 000 000

Dar, în afară de reacțiile obișnuite, se consideră pozitive și reacțiile în care hemaglutininele au fost parțial adsorbite și pe extractul de rinichi de cobai, aceasta numai în cazul în care adsorbția nu depășește 75% din titrul de adsorbție pe hematiile de berbec.

Exemplu: seria A = 1/320; seria B = 0; seria C = 1/80.

Titrul 1/160 în seria C arată o adsorbție de 25%, deci mai mică decît limita semnalată (75%); în consecință, reacția din exemplul dat poate fi considerată o reacție pozitivă pentru mononucleoza infecțioasă.

Tot ca o excepție, trebuie considerat și faptul semnalat de Lépine și Sohier și anume, posibilitatea ca în cazuri tipice de mononucleoză infecțioasă adsorbția aglutininelor pe extractul de hematii de bou să se facă în proporție de 98,5% și nu de 100%.

Există însă și reacții serologice negative la 10—20% din bolnavii cu simptomatologie tipică de mononucleoză. Aceste rezultate s-ar datora fie unor anticorpi incompleți, fie practicării reacției prea aproape sau prea tîrziu în raport cu debutul bolii, fie existenţei unor forme de boală cu simptomatologie clinică asemănătoare mononucleozei infecţioase, dar cu etiologie diversă.

Studiul histopatologic al ganglionilor limfatici

Un element util diagnosticului îl furnizează uneori studiul histologic al ganglionilor limfatici. Se pot obţine date preţioase *prin examenul produsului de puncţie ganglionară* (adenograma), mai rar prin *studiul microscopic al secţiunilor de ganglion* prelevat biopsic.

Adenograma se execută simplu. Se practică o puncţie ganglionară cu ajutorul unui ac de seringă mai gros, de tip intravenos, iar cu sucul obţinut prin puncţie se fac, pe lame perfect curate, 2—3 frotiuri (de preferinţă prin întinderea picăturilor de suc cu ajutorul unei lame şlefuite).

Frotiurile se colorează cu metoda May-Grünwald-Romanowski-Giemsa (după tehnica uzuală în hematologie).

La examenul microscopic se constată aspecte polimorfe, ca şi în frotiurile din sîngele periferic, dar dominate de prezenţa a numeroase limfocite; în linii mari, aspectul lamei traduce hiperplazia ţesutului limfo-reticular.

Astfel, pe lamă se întîlnesc numeroase elemente limfocitare tinere şi numeroase mononucleare atipice (celule mari, de 9—15 μ, cu nuclei prezentînd o reţea cromatiniană grosolană, cu grunji cromatici, cu o citoplasmă intens bazofilă, mai puternic colorată la periferie, cu numeroase vacuole mici). Se găsesc, de asemenea, numeroase celule cu morfologie variată, cu aspecte de trecere de la aceste celule la plasmocite. De remarcat numărul mare de kariokineze.

După Haţieganu şi Spîrchez, deosebirea capitală dintre adenograma din cursul mononucleozei infecţioase şi cea din leucemia limfatică o constituie numărul mic de limfoblaşti şi numărul mare de elemente de origine reticulară, în viroza de care ne ocupăm.

În convalescenţă adenograma recapătă aspectul normal, fiind dominată de limfocite adulte.

Examenul histologic al ganglionilor limfatici prelevaţi biopsic este de asemenea cerut uneori inframicrobiologului.

Faptul că în general însă aspectul histopatologic al ganglionilor limfatici nu este suficient de caracteristic ne face să nu recomandăm pentru diagnostic folosirea acestui procedeu.

Concluzii

Diagnosticul de laborator al mononucleozei infecţioase se stabileşte pe baza examenului hematologic (hiperleucocitoză moderată şi prezenţa în formulă a unui număr foarte mare de mononucleare, celule limfoidale) şi pe baza pozitivităţii reacţiei de hemaglutinare tip Hăngănuţiu-Paul-Bunnell-Davidsohn (adsorbţie totală pe extractul de hematii de bou şi nulă, pe extractul de rinichi de cobai).

În anumite ocazii, şi în special pentru diagnosticul diferenţial cu leucemia limfoidă, se poate recurge la studiul adenogramei.

BIBLIOGRAFIE

BUNNEL W. — *Amer. J. med. Sci.*, 1933, nr. 186, p. 346.

CAJAL N. — Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1958.

CRĂCIUN EM., CÎRNARU S., DEMETRU N., Probleme de morfopatologie, Ed. Acad., R.P.R., Bucureşti, 1960.

KOUBA K. — Infeknimononukleosa, Statu. Zdrovotu naklodatelstul, Praha, 1961.

MARINESCU G. — Limfocitoza infecţioasă şi mononucleoza infecţioasă, Ed. medicală, Bucureşti, 1960.

MARINESCU G. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1962, vol. 13, p. 569.

SĂRĂŢEANU D. — *Microbiologia* (*Bucureşti*), 1959, nr. 2, p. 175.

SOHIER R. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1962, vol. 13, p. 537.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TURBĂRII

Unul din diagnosticele pe care inframicrobiologul trebuie să le stabilească cu rapiditate şi precizie este cel al turbării şi acesta nu la omul bolnav, ci la animalul muşcător[1]; precizarea unor juste măsuri terapeutico-profilactice depinde în primul rînd de promptitudinea răspunsului laboratorului de specialitate.

Diagnosticul se stabileşte în baza examenelor histopatologice şi a celor biologice (transmiterea bolii la animalele de laborator sensibile).

---

[1] În ţara noastră cele mai multe examene se fac la cline.

Diagnosticul histopatologic al turbării. Înainte de a trece la descrierea tehnicii de recoltare și examinare a materialului patologic trebuie să amintim conduita pe care specialistul trebuie să o urmeze față de animalul mușcător suspectat de turbare.

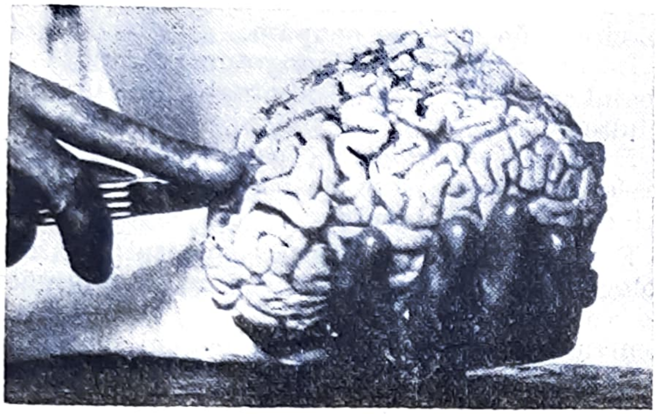


Fig. 549. — Secționarea creierului pentru punerea în evidență a cornului Ammon.

Astfel, dacă animalul nu prezintă semne de boală, el va fi urmărit atent de un medic veterinar, iar la primele semne de boală, izolat, așteptîndu-se moartea lui; nu va fi sacrificat decît în cazul unei agonii prelungite.

În caz că animalul este bolnav, cu stabilirea diagnosticului clinic de rabie, animalul va fi sacrificat în cursul agoniei sale.

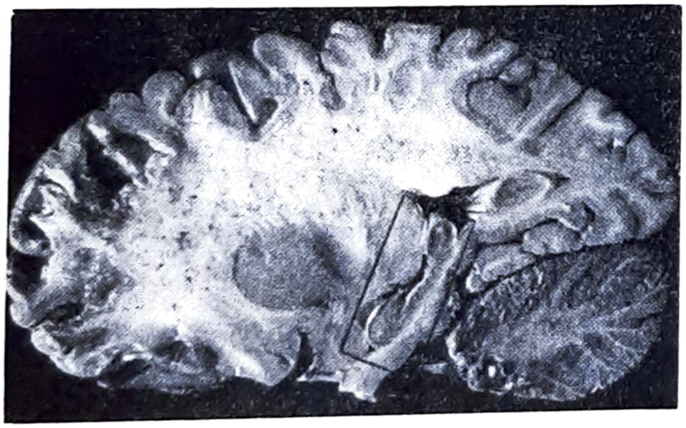


Fig. 550. — Aspectul cornului Ammon pe o secțiune longitudinală de creier.

Situația cea mai dificilă se prezintă atunci cînd animalul a fost sacrificat înainte de a prezenta simptome morbide sau imediat după declanșarea lor; în unele din aceste cazuri, inframicrobiologul poate fi pus în imposibilitatea de a decela leziunile caracteristice, sacrificarea animalului fiind făcută înainte de apariția incluziilor histopatologice specifice și în consecință, să nu poată da un răspuns competent decît după 8—12 zile, pe baza rezultatului probelor biologice.

Deși pentru examenul histopatologic necesităm numai sistemul nervos central, recomandăm să se facă necropsia completă a animalului care poate furniza elemente extrem de utile. Este vorba de punerea în evidență, la deschiderea stomacului animalului, a prezenței unor elemente cu totul neobișnuite (paie, pietre, bucățele de lemn, iarbă etc.), consecință a pervertirii gustului în decursul bolii.

Fără îndoială însă, că adevăratul diagnostic histopatologic se face la nivelul sistemului nervos central.

Prelevarea creierului la cîine nu este o operație simplă și totdeauna trebuie luate măsuri pentru evitarea infectării accidentale a experimentatorului. Pentru aceasta se recomandă necropsierea animalului cu mîinile protejate de mănuși groase de cauciuc.

Cadavrul cîinelui sau numai capul său detașat [1] va trebui bine fixat în tava de necropsie.

În timp ce cu o pensă Davier se ține fix botul cîinelui, cu ajutorul, unui cuțit bine ascuțit sau bisturiu se face o incizie mediană a pielii, fasciei și mușchilor craniului, de la ceafă la botul animalului, bineînțeles după badijonarea părului cu alcool și apoi cu tinctură de iod. Se disecă pielea și mușchii craniului și se răsfrîng lateral. Uneori mușchii temporali sînt foarte groși în regiunea temporo-parietală, ceea ce obligă îndepărtarea lor.

După flambarea calotei craniene curățate de mușchi se face, cu ajutorul unui fierăstrău chirurgical, o incizie circulară a craniului (se începe în regiunea occipitală, înaintînd către oasele frontale), după care, cu costotomul, se ridică calota.

Folosindu-ne de o foarfecă ascuțită și de o pensă, se secționează meningele, lambourile sale fiind apoi răsfrînte lateral. Se secționează cu foarfeca legăturile encefalului (bulbii olfactivi, nervii cranieni, pedunculii), după care acesta se extrage din cutia craniană și se introduce într-o cutie Petri mare, sterilă.

Întotdeauna, pentru controlul bacteriologic, trebuie prelevat un mic fragment de encefal și introdus într-un tub cu bulion de cultură.

---

[1] Unii cercetători preferă fixarea capului cîinelui într-un dispozitiv mecanic de tipul unei menghine.

Datorită faptului că diagnosticul histologic al turbării se bazează în primul rînd pe decelarea incluziilor rabice specifice, corpii Babeş-Negri, vor trebui recoltate din encefal porţiuni din regiunile în care aceste formaţiuni se găsesc de predilecţie (cornul Ammon[1], scoarţa cerebrală, creieruşul). Din fiecare din aceste regiuni se va păstra o porţiune proaspătă pentru executarea de frotiuri şi pentru treceri la animalele sensibile, în timp ce cîte un fragment va fi introdus în soluţia fixatoare preferată.

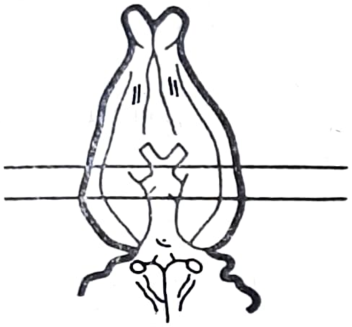


Fig. 551. — Schema secţionării creierului de iepure, hamster, şobolan etc. pentru evidenţierea cornului Ammon.

Identificarea corpilor Babeş-Negri se poate face pe frotiuri sau pe secţiuni realizate după una din numeroasele metode recomandate, dintre care unele rapide.

Descrise de V. Babeş în 1887 şi apoi de Negri în anul 1903, incluziile rabice, corpii Babeş-Negri reprezintă criteriul patognomonic al modificărilor histologice în turbare. Valoarea lor diagnostică este incontestabilă.

De formă rotundă sau ovalară, ele pot fi întîlnite şi sub formă alungită, amiboidă etc., prezentînd cel mai des o structură internă caracteristică, constituită din particule mici bazofile, mai mult sau mai puţin numeroase, aşezate neregulat. Incluziile au dimensiuni cuprinse între 1 μ şi 27 μ, de obicei între 1 şi 5 μ (fig. 552).

Situate 1—2—4 sau chiar mai multe în citoplasma celulelor nervoase, incluziile rabice pot fi găsite cu totul excepţional, în special în turbarea cu incubaţie extrem de lungă şi în nucleii unor neuroni (Nicolau şi colab., Cajal şi colab.).

Ele prezintă o oxifilie marcată, ceea ce face ca cel mai des, cu coloraţiile obişnuite, să apară în diferite nuanţe de roşu; uneori, în special în cazul unor tulpini de virus puţin virulente, această afinitate oxifilă este slabă sau chiar nulă, incluziile apărînd în albastru-palid sau albastru-violaceu.

Incluziile rabice pot fi puse în evidenţă pe frotiuri, dar mai ales pe secţiuni.

Pe frotiuri, evidenţa incluziilor se poate face după coloraţia cu metoda Sellers sau Muronţev.

Trebuie însă precizat că, deşi aceste metode pot aduce reale servicii unui diagnostic rapid, ele pot genera totodată confuzii între incluziile rabice şi cele jigodioase (incluziile Lenz), care se pot găsi uneori în cantitate apreciabilă în cornul Ammon al cîinilor, la care această viroză este foarte răspîndită.

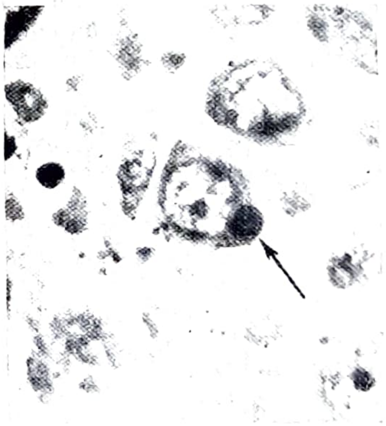


Fig. 552. — Incluziuni Babeş-Negri în citoplasma celulelor nervoase din creierul unui hamster infectat experimental cu virusul rabic de stradă (coloraţie Mann).

Şt. S. Nicolau a arătat că această confuzie nu este însă posibilă pe secţiuni, unde se poate uşor constata că incluziile jigodioase au întotdeauna sediul în citoplasma celulelor gliale şi rareori în neuroni, în timp ce corpii Babeş-Negri se găsesc numai în citoplasma celulelor nervoase.

---

[1] Cornul Ammon va putea fi pus în evidenţă şi prelevat după o tehnică foarte simplă: cu ajutorul unui cuţit de creier sau cu o foarfecă mare, bine ascuţită, se face cîte o incizie longitudinală, paralelă cu scizura mediană, la 1,5—2 cm în afara acesteia (fig. 549). Despărţind porţiunile secţionate, vom vedea foarte clar cornul Ammon drept şi stîng, sub forma unui corp alb-strălucitor, semicilindric, care iese în relief pe planşeul ventriculului lateral (fig. 550). Dacă la cîine, maimuţă şi om, descoperirea cornului Ammon se face după tehnica de mai sus, la animalele mai mici de laborator (iepure, cobai, şobolan, şoarece) se recomandă practicarea unei secţiuni transversale, perpendiculară pe scizura mediană, la nivelul de separaţie dintre treimea posterioară şi cele 2 treimi anterioare ale encefalului (fig. 551); cornul Ammon apare evident.

Această distincţie este greu de făcut pe frotiuri, unde cercetarea corpilor Babeş-Negri trebuie făcută cu multă atenţie şi chiar cu prudenţă.

Iată, după T. F. Sellers, o schemă ce permite diferenţierea pe frotiuri a incluziilor rabice de alte incluzii nespecifice :

Corpii Babeş-Negri :

Prezenţa de granulaţii interne bazofile.
Substanţă fundamentală heterogenă.
Structură slab refringentă.
Tentă magenta.

Incluzii nerabice :

Absenţa structurii interne.
Substanţă fundamentală omogenă.
Structură puternic refringentă.
Tentă mai acidofilă (mai roză).

Dificultăţile semnalate justifică însă recomandarea studiului incluziilor caracteristice, pe secţiuni de sistem nervos.

Datorită necesităţii unui răspuns de urgenţă al laboratorului, fixarea şi incluzionarea fragmentelor de nevrax vor trebui făcute după metode rapide.

Secţiunile de sistem nervos obţinute, de preferinţă de 5—7 μ, vor fi colorate cu una din metodele descrise, de preferinţă cu metoda Mann.

Indiferent de metoda folosită, incluziile rabice, aproape întotdeauna înconjurate de o zonă clară, de un halo caracteristic, se disting net de restul formaţiunilor citologice. Datorită structurii lor interne, ele vor putea fi uşor diferenţiate de incluziile ,,spontane'', de cele din hepatita infecţioasă a cîinelui sau de alte formaţiuni similare.

Corpii Babeş-Negri se găsesc în număr variat în citoplasma diferitelor celule nervoase; procentajul cel mai mare se întîlneşte în stratul central de celule piramidale din cornul Ammon şi din hipocamp, în bucla inferioară şi stratul mijlociu al neuronilor ganglionari din cornul Ammon şi în celulele Purkinje din creieruş. Incluzii mai puţin numeroase se întîlnesc în neuronii zonelor motorii, ai nucleilor bulbari şi în cei ganglionari, putînd fi însă întîlnite în neuronii de la orice nivel al organismului.

Recent A. Pellissier şi E. Trinquier au semnalat că uneori, la animalele de laborator, excelenta metodă Mann poate favoriza unele confuzii între anumite incluzii ,,spontane'' din citoplasma unor neuroni şi corpii Babeş-Negri.

Pentru aceasta, aceşti autori recomandă, în caz de dubiu, folosirea coloraţiei cu hematoxilină fosfotungstică a lui Mallory. Secţiunile abundent spălate sînt introduse pentru 4—6 ore în amestecul colorant compus din :

Hematoxilină	0,1 g
Apă distilată	80,0 ml
Acid fosfotungstic, sol. 10%	20,0 ml
Perhidrol	0,2 ml

(Se solvă întîi hematoxilina, se adaugă acidul şi apoi perhidrolul). După trecerea celor 4—6 ore, secţiunile se spală abundent cu apă.

Rezultate. Incluziile ,,spontane'' apar colorate în albastru-negru, în timp ce corpii Babeş-Negri, în galben-roz.

Evidenţierea rapidă a incluziilor rabice cu ajutorul microscopului cu contrast de fază. Într-o serie de lucrări, efectuate în Institutul de inframicrobiologie, am arătat bunele rezultate obţinute în diagnosticul rapid al turbării prin evidenţierea incluziilor specifice cu ajutorul microscopului cu contrast de fază.

Iată tehnica pe care am folosit-o, împreună cu S. Mateescu şi rezultatele obţinute :

Fixarea. Fragmentele subţiri (1 mm) de sistem nervos (corn Ammon, cortex) sînt fixate în amestecul Dubosq-Brasil-Bouin la 60°, timp de 5 minute [1], sau în formol 10% (soluţie salină), la temperatura de fierbere.

Secţionarea. După fixarea rapidă, fragmentele de ţesut nervos sînt spălate în apă distilată şi apoi secţionate la microtomul de gheaţă. Secţiunile de 20—30 μ, trecute rapid prin alcool absolut şi toluol, sînt montate în balsam de Canada şi examinate cu microscopul cu contrast de fază. Examinarea se face cu obiectivul cu imersie, după ce în prealabil s-au identificat cu un obiectiv mic grupurile de neuroni (stratul central piramidal din cornul Ammon etc.).

---

[1] Deşi această fixare este suficientă, pentru o mai sigură şi mai comodă manipulare a fragmentelor de nevrax infectate este recomandat a se face fixarea în 2 timpi : într-un prim timp, fragmentele de 5 mm sînt menţinute în amestecul fixator 5 minute la 60°, apoi, după secţionare în piese de 1—2 mm grosime, se continuă fixarea încă 5 minute, în aceleaşi condiţii. Menţinerea fragmentelor virulente timp de 10 minute la 60° distruge în mod sigur virusul rabic.

Rezultate. Structura celulară apare clară, cu numeroase amănunte, în special la nivelul nucleilor. În citoplasma a numeroase celule nervoase se văd distinct corpii Babeș-Negri, colorați în cenușiu-verzui, pe fondul gălbui al preparatului.

În unele incluzii se poate observa structura internă, asemănătoare cu cea pusă în evidență cu metodele clasice de colorare (fig. 553).

Identificarea incluziilor rabice cu microscopul cu contrast de fază este cît se poate de ușoară chiar pentru un ochi neexperimentat, fapt care permite folosirea cu succes a acestei metode simple în diagnosticul rapid al turbării. Recent, A. A. Avakian și A. I. Vanog preconizează, la rîndul lor, microscopia cu contrast de fază pentru diagnosticul rabiei, însă pe preparate colorate cu amestecul Romanowski-Giemsa.

Deși punerea în evidență a corpilor Babeș-Negri reprezintă un criteriu sigur pentru diagnosticul turbării, există situații în care inframicrobiologul nu poate decela prezența lor.

Aceasta se poate întîmpla fie în cazul în care animalul a fost sacrificat în perioada incubației, în primele ore ale bolii, fie, bineînțeles, cînd animalul mușcător a murit din alte cauze decît de rabie.

În astfel de situații, inoculările la animale sensibile se impun. Specialistul va trebui însă să știe că în afară de incluziile caracteristice, în cursul turbării apar și alte modificări morfopatologice, traducînd o meningoencefalită (meningită, infiltrație parenchimatoasă și perivasculară, prezența nodulilor encefalitici Babeș). Aceste modificări permit un *diagnostic de probabilitate* și obligă indicarea începerii tratamentului antirabic.

Absența unor modificări cît de discrete la nivelul sistemului nervos permite inframicrobiologului să susțină ca *neprobabil* diagnosticul de rabie și să aștepte rezultatele inoculărilor sale.

Diagnosticul biologic al turbării. Datorită existenței unor cazuri de turbare în care prezența corpilor Babeș-Negri nu poate fi pusă în evidență, completarea examenului histopatologic cu inocularea la animalele de laborator sensibile este obligatorie.

Deși majoritatea autorilor consideră necesară inocularea emulsiilor de substanță nervoasă recoltată de la animalul mușcător, numai în cazurile histologic negative sau dubioase, noi recomandăm ca proba pe animal să fie executată în toate cazurile. Aceasta va permite, pe de o parte, cîștigarea de timp în cazurile negative sau dubioase histologic, iar pe de altă parte va întări diagnosticul.

Inocularea se poate face la șoarece, hamster, cobai, iepure sau șobolan. Datorită însă faptului că șoarecele alb și hamsterul s-au dovedit a fi animalele cele mai sensibile la inocularea intracerebrală a virusului rabic, se recomandă alegerea lor.

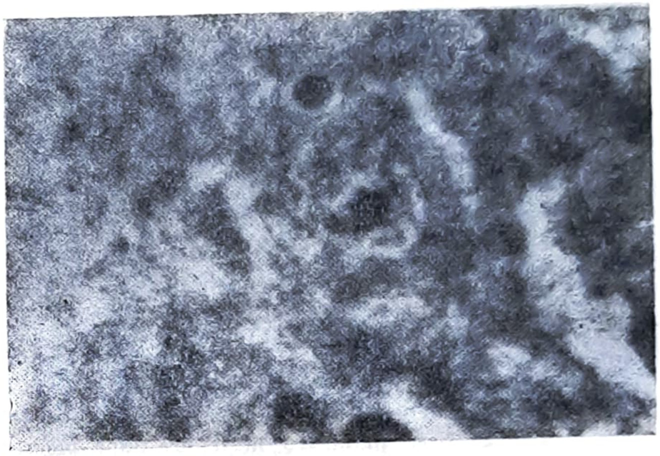


Fig. 553. — Incluziune rabică într-un neuron encefalic de iepure, evidențiată cu ajutorul microscopului de contrast de fază.

Pregătirea materialului de inoculat. Produsul de inoculat constă în suspensia de țesut nervos, preparată prin triturarea unor fragmente de corn Ammon, scoarță, creieruș și eventual bulb. (Este recomandabilă recoltarea de fragmente din ambele emisfere.) Triturarea se face în condiții sterile, fie cu o baghetă de sticlă într-un pahar conic, fie într-un mojar, cu ajutorul unui pistil. După ce țesutul a fost bine triturat, se adaugă lichidul diluant (ser fiziologic), cu sau fără adaos de ser inactivat de cal sau de om [1], astfel ca să se obțină o suspensie de 10%, la greutate.

Dacă prelevarea sistemului nervos a fost făcută în perfecte condiții de asepsie, suspensia virulentă se lasă ca atare; dacă însă se suspectează cîtuși de puțin sterilitatea bacteriană, este obligatorie adăugarea de antibiotice (penicilină 500 u.i., streptomicină 200 μg, pentru fiecare volum de suspensie). După adaosul de antibiotice, suspensia se agită și se menține ca atare la +4°, 15—30 de minute, după care se centrifughează timp de 5 minute la 1 500 turații/min.; pentru inoculare se va folosi lichidul supernatant [1].

---

[1] Virusul rabic nu necesită un lichid diluant anumit; experimentarea dă rezultate foarte bune cu oricare din diluantele întrebuințate.

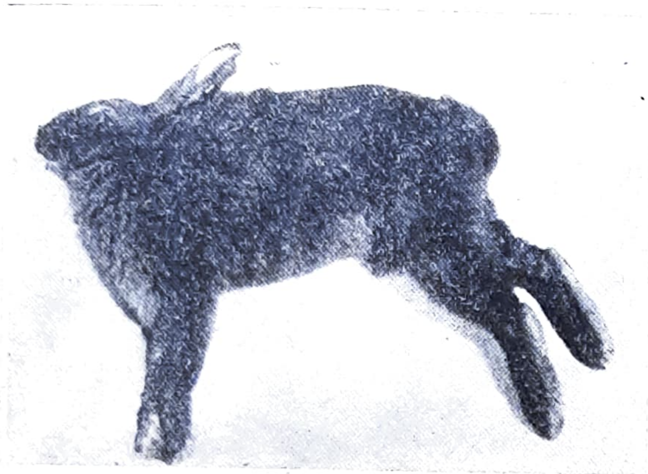


Fig. 554. — Turbare paralitică la iepure după inocularea intracerebrală a virusului de stradă.

Inocularea produsului virulent se va face pe cale cerebrală, cu precauție, pentru a se evita accidentele (stropirea cu lichidul patogen, prin neadaptarea perfectă a acului la amboul seringii, înțeparea cu acul infectat etc.).

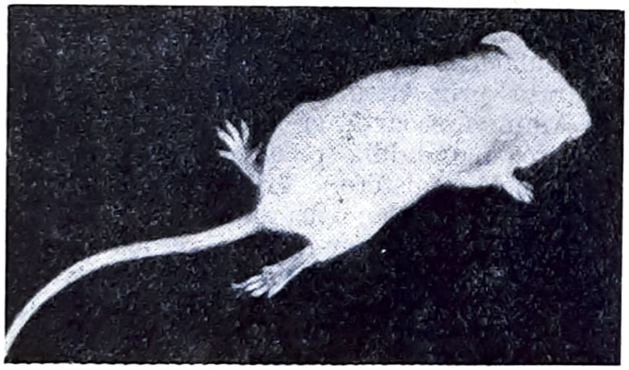


Fig. 555. — Turbare paralitică la șoarece după inocularea virusului de stradă pe cale intramusculară.

Nu se vor inocula nici o dată două suspensii virulente diferite cu aceeași seringă, decît după o prealabilă sterilizare prin fierbere.

Animalele, marcate cu grijă, vor fi izolate în cuști sau borcane acoperite cu capace de sîrmă protectoare și observate cu atenție, zilnic, de mai multe ori, pentru a putea decela simptomele morbide care foarte des evoluează extrem de rapid.

Simptomatologia turbării la animalele de laborator sensibile are în general următoarele caractere: după o incubație obișnuită, de 6—15 zile, animalul devine apatic sau agitat, prezintă părul zburlit, tremurături, contracții clonice sau tonice, paralizia trenului posterior, uneori o paralizie generalizată, urmată de o stare de prostrație (fig. 554; 555; 556). După instalarea agoniei, moartea survine repede la șoarece și după o perioadă mai lungă la hamster[2].

Trebuie știut că aceste animale pot face forma furioasă, cu tendința de a mușca.

Simptomele descrise mai sus pot fi întîlnite în totalitate sau în parte; la șoarece, ele uneori pot chiar să lipsească, animalul sucombînd fără simptome premonitorii.

La moartea animalelor inoculate se va face obligatoriu necropsia cu controlul bacteriologic. Creierul prelevat după tehnica obișnuită va fi folosit pentru studii histopatologice (partea posterioară obținută după secționarea sa transversală) și pentru un eventual control biologic (treceri la alte animale, probe de seroneutralizare etc.). În acest scop, se recomandă introducerea de fragmente din porțiunea anterioară a creierului în flacoane cu glicerină tamponată și menținerea la ghețar.

Animalele ce nu vor prezenta simptome morbide timp de 30 de zile vor putea fi, după această perioadă de timp, scoase din experiență și obligatoriu sacrificate.

Există cazuri în care inframicrobiologul este pus în situația de a primi pentru diagnostic nevraxul animalului suspect de rabie, în stare de putrefacție avansată, infectat secundar (în special cînd recoltarea encefalului s-a făcut în condiții septice, iar transportul în condiții improprii).

În acest caz, după tratare cu antibiotice și centrifugare, suspensia virulentă se inoculează în mușchii cefei cobaiului. Chiar dacă la locul de inoculare a produsului virulent au apărut procese supurative, virusul rabic propagat pe cale nervoasă declanșează turbarea caracteristică, cu sterilitatea bacteriană a encefalului, la nivelul căruia se va putea diagnostica rabia, atît histopatologic (prezența corpilor Babeș-Negri), cît și biologic (treceri în serie).

---

[1] Centrifugarea nu este obligatorie. Se poate folosi lichidul supernatant după sedimentarea obținută prin menținerea neagitată a suspensiei timp de 10—30 de minute.

[2] Agonia prelungită la hamster are un deosebit avantaj, prin favorizarea apariției unui mare număr de incluzii caracteristice și, în consecință, pentru stabilirea unui diagnostic microscopic mult facilitat.

În lipsa cobailor, produsele rabigene septice vor putea fi inoculate intracaudal la șoarece sau în mușchii coapsei la hamster. Animalele astfel inoculate vor face boala caracteristică, permițînd diagnosticul de turbare.

Bazați pe faptul că virusul, deși prezent în nevrax, nu se găsește în toate cazurile și în salivă, unii autori preconizează, pe lîngă inocularea suspensiei cerebrale, și a celei obținute din glandele salivare (în special glanda submaxilară, ușor de prelevat la cîine).

Considerăm utilă această probă suplimentară numai în cazul în care, la cel mușcat, administrarea vaccinului antirabic prezintă serioase contraindicații.

Diagnosticul serologic al turbării. Testele serologice sînt puțin folosite în diagnosticul rabiei și numai în scopul identificării suplimentare a unui virus izolat (reacția de seroneutralizare). Aceasta se efectuează după tehnica obișnuită.

Serul imun întrebuințat va fi preparat pe iepure sau cobai. Imunizarea animalului ce va furniza serul va trebui făcută obligatoriu cu produs homolog (creier de iepure, respectiv de cobai).

Iată o bună tehnică pentru prepararea unui ser antirabic pe iepure sau cobai.

Se prepară în apă distilată o emulsie concentrată 1/5 de creier de iepure mort în urma inoculării de virus rabic fix.

Se centrifughează și apoi, se recoltează lichidul supernatant; se măsoară o parte din această suspensie virulentă și se înglobează picătură cu picătură într-o cantitate aproximativ egală de lanolină, omogenizînd amestecul cu răbdare, într-un recipient în prealabil răcit. După ce s-a treminat înglobarea soluției apoase, se adaugă fracționat părți egale de ulei de parafină, în care, în prealabil, s-au introdus 2 mg substanță uscată de *Mycobacterium butiricum* omorît prin căldură. Din emulsia astfel preparată se injectează la iepure, pe cale musculară (mușchii șanțurilor vertebrale), într-o singură ședință, 2—4 ml. Această cantitate va fi fracționată și injectată în 4 puncte diferite din masele musculare paravertebrale.

Sîngerarea iepurelui se va face la 5—6 săptămîni de la inoculare, de preferință după un rapel apos făcut cu 8—10 zile mai înainte.

Diagnosticul turbării cu ajutorul anticorpilor fluorescenți

În lucrări recente s-a arătat că tehnica anticorpilor fluorescenți are o deosebită aplicare în diagnosticul de laborator rapid al turbării. După diverși autori, metoda este deosebit de precisă, putînd decela prezența virusului rabic atît în nevrax, cît și in glandele salivare.

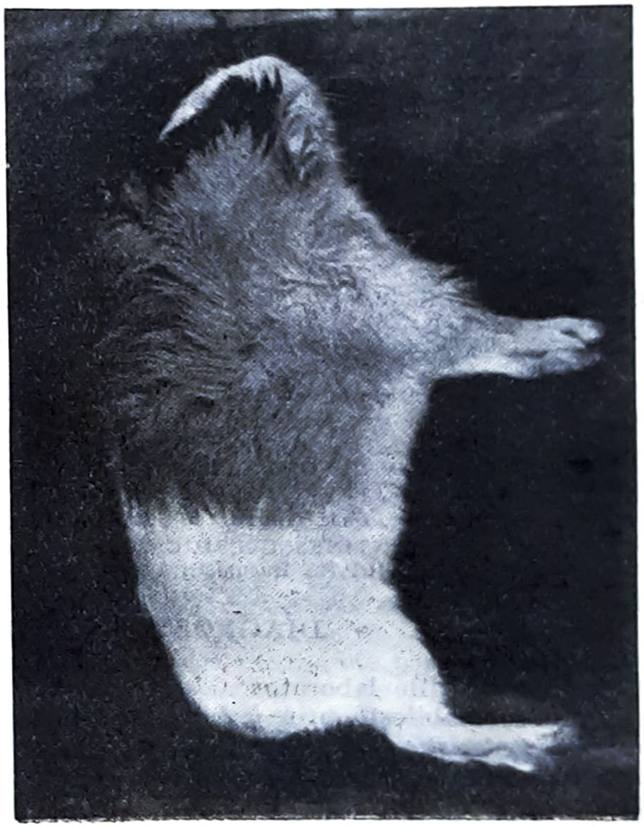


Fig. 556. — Turbare paralitică la cobaiul inoculat intracerebral cu virusul de stradă.

Pentru diagnostic se poate folosi atît metoda directă, cît și metoda indirectă. În metoda directă, frotiurile realizate prin impresiune din creier sau glande salivare sînt fixate în acetonă (4 ore la —20°). După acest timp, frotiurile se acoperă cu γ-globulinele specifice, cuplate cu izotiocianat de fluoresceină [1] și incubate într-o cameră umedă, 30 de minute, la 37°. După acest interval de timp frotiurile sînt spălate cu ser fiziologic tamponat, pentru îndepărtarea complexului nefixat de antigenul rabic. Se usucă și se montează cu glicerină cu un pH ajustat la 9 (alcalinitatea este necesară asigurării fluorescenței).

---

[1] Rezultate bune se obțin cu γ-globulinele extrase din serul antirabic preparat pe cal.

Examinarea se face în lumină ultravioletă.

Rezultate. Prezența virusului rabic este tradusă prin zone de fluorescență verzuie strălucitoare, pe fondul albastru închis al țesutului.

Concluzii.

Diagnosticul de laborator al turbării se stabilește pe baza decelării incluziilor caracteristice, corpii Babeș-Negri, în citoplasma neuronilor din encefalul animalului suspectat sau al indivizilor morți cu această afecțiune.

Prezența incluziilor rabice precizează diagnosticul, absența lor nu-l exclude însă.

Proba biologică, de inoculare la animal, va trebui executată paralel cu cercetările histologice și în special în cazurile în care corpii Babeș-Negri lipsesc.

Reproducerea bolii experimentale la animalul de laborator, de preferință la hamster sau șoarece, precizează diagnosticul.

Dintre probele serologice se folosește reacția de seroneutralizare, în scopul identificării unui virus izolat.

Tehnica anticorpilor fluorescenți, de scurt timp întrebuințată, dă speranța rezolvării cu succes a unui diagnostic rapid în această afecțiune.

BIBLIOGRAFIE

CAJAL N., MATEESCU S. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1955, vol. 6, p. 35.

CAJAL N., MATEESCU S. — *G. Mal. infett.*, 1957, nr. 9, p. 233.

CĂRUNTU FL. — *Microbiologia* (București), 1961, nr. 5, p. 377

CONSTANTINESCU N. M., CAJAL N., BÎRZU N., CEPLEANU M., ZAVATE O. — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1960, vol. 11, p. 61.

LÉPINE P. — *C.R. Soc. Biol.*, (*Paris*), 1935, vol. 113, p. 804.

NICOLAU S., CONSTANTINESCU N. M., CAJAL N. — Turbarea, Ed. Acad. R.P.R., București, 1962.

NICOLAU S., KOPOCIOWSKA L. — *C.R. Soc. Biol.*, (Paris), 1934, vol. 115, p. 1 094.

NICOLAU S., KREINDLER A., PORTOCALĂ R., OLTEANU I., STROESCU P., — *Stud. Cercet. Inframicrobiol.*, 1950, vol 1, nr. 2, p. 27.

PELLISSIER A., TRINQUIER E. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, vol. 83, p. 410.

ȘTIRBU A. — *Microbiologia* (*București*), 1959, nr. 3, p. 267.

TUREVICI E. I., AVAKIAN A. A. — *Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.*, 1950, nr. 73, p. 1 053.

WILSNACK R. — *J. Amer. vet. med. Ass.*, 1960, vol. 137, p. 319.

VANAG A. I. — *Ž. Mikrobiol.* (Mosk.), 1955, nr. 6, p. 90.

DIAGNOSTICUL TIFOSULUI EXANTEMATIC

Diagnosticul de laborator al tifosului exantematic se stabilește prin *izolarea inframicrobului caracteristic* (*Rickettsia prowazeki*, pentru tifosul epidemic; *Rickettsia mooseri*, pentru tifosul endemic) și mai ales prin *reacții serologice.*

Izolarea inframicrobului

Cu toate că atît *Rickettsia prowazeki*, cît și *Rickettsia mooseri* s-au dovedit a fi patogene pentru mai multe specii animale (cobai, șoarece, spermofil etc.), pentru izolarea curentă se folosește exclusiv cobaiul; acesta este inoculat intraperitoneal cu 3—4 ml sînge total, recoltat în primele 5 zile de boală sau, așa cum recomandă P. F. Zdrodowski, cu trituratul cheagului de sînge. Într-o fază mai avansată a bolii se pot obține rezultate pozitive numai cu sînge medular (puncție sternală).

Pentru experimentare se preferă cobaii masculi, adulți (300—350 g); aceștia vor fi termometrizați 3 zile înainte de inoculare și apoi de două ori pe zi.

În cazul unei inoculări pozitive cu *R. prowazeki*, animalul [1] prezintă după o incubație variabilă (5—20 de zile) o reacție febrilă moderată (1—$1^1/_2$ grad deasupra normalului), care durează 5—10 zile (fig. 557), fără nici o altă simptomatologie.

În cazul tifosului endemic murin (*R. mooseri*), se constată, după o incubație mai scurtă, în afară de febră și o *reacție scrotală*, caracterizată prin edemul și hipertrofia testiculelor, care, indolore și imobile, nu mai pot fi introduse în abdomen; pielea scrotului este edemațiată și hiperemiată.

La necropsie se constată un edem al țesutului celular subcutanat și al tunicii vaginale, care conține și o redusă cantitate de exsudat hemoragic. Suprafața testiculelor prezintă, de asemenea, puncte hemoragice.

---

[1] Există și rare animale la care infecția exantematică evoluează fără febră, cu infecțiozitatea crescută a sîngelui, a creierului și a celorlalte organe obișnuit virulente; aceasta obligă inocularea a cel puțin 2—3 cobai cu fiecare produs de diagnosticat

Pe frotiuri făcute cu produsul de raclaj superficial al tunicii vaginale se văd după colorațiile de elecție, frecvente celule endoteliale burate de corpusculi rickettsieni.

Pentru menținerea tulpinii rickettsiene izolate se fac treceri pe cale peritoneală cu suspensia de creier recoltat de la animalul sacrificat la 4 zile de la apariția febrei sau cu sînge obținut prin puncție cardiacă, în plină perioadă febrilă; o metodă mai comodă este însă inocularea produsului virulent în sacul vitelin al embrionului de găină. Se folosesc embrioni în vîrstă de 6 zile, iar după inoculare ouăle se mențin la +37°. Examinate zilnic, la ovoscop, se va constata la 3–4 zile o încetinire a mișcărilor, urmată de moartea embrionului; uneori, moartea embrionilor survine cu regularitate, abia după 2–4 treceri.

Pentru identificarea germenului izolat, foarte bune rezultate se obțin cu reacția de fixare a complementului, cu reacția de neutralizare sau cu reacția de aglutinare a corpusculilor elementari.

De un real folos pentru diagnosticul rickettsiozei (fără posibilitatea de stabilire a tipului) este și examenul virusoscopic (colorarea impresiunilor de membrană vitelină sau de organe recoltate de la animalele infectate – creier, splină – iar în caz de fenomen scrotal și din tunica vaginală, cu una din metodele de elecție – Grațian, Castaneda etc.).

Rickettsiile prezintă de obicei un aspect polimorf, corpusculii cocciformi, ovalari, bacilari, filamentoși avînd o talie medie cuprinsă între 0,5 și 2,5 μ. Există bineînțeles și forme granulare, pulverulente, ca și forme mari, filamentoase.

Metode serologice

Diagnosticul tifosului exantematic se stabilește însă curent cu ajutorul metodelor serologice (reacția Weil-Felix, reacția de fixare a complementului, metodă recomandată, și reacția de aglutinare a corpusculilor elementari rickettsieni, în special reacția de microaglutinare).

Seroreacția Weil-Felix executată, după tehnica originală sau după diferitele variante ale sale, poate fi folosită, atît pentru diagnosticul serologic propriu-zis al bolii, cît și pentru decelarea bolii la unele animale infectate experimental.

Diagnosticul serologic propriu zis. Reacția este utilă, în special în al doilea septenar de boală, cînd apare pozitivă la 87,5% din bolnavi. În primul septenar, indicele de pozitivitate este redus (20–50%).

Se consideră ca titru valabil de diagnostic un titru de 1/200 sau superior.

Dat fiind că reacția se negativează precoce (la 3 luni de la vindecare s-a dovedit pozitivă numai la 8% din foștii bolnavi), ea nu permite un diagnostic retrospectiv.

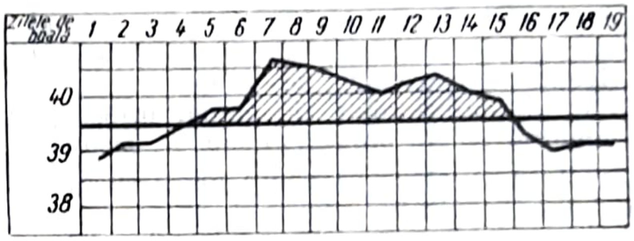


Fig. 557. — Curba temperaturii la un cobai inoculat cu *Rickettsia prowazeki*.

De remarcat că în recidive reacția este pozitivă numai în 22,6%, iar la vaccinații antiexantematic în 50% din cazuri și numai în titruri coborîte.

Dat fiind că reacția este uneori pozitivă și în unele myagawele, ca și în unele infecții cu *Proteus* (pielite, cistite etc.), că este pozitivă în titruri semnificative de diagnostic, tardiv (în al 2-lea septenar), că în unele cazuri tipice titrul nu crește în timp, că nu cuprinde totalitatea bolnavilor și că se negativează repede, reacția Weil-Felix este înlocuită din ce în ce mai mult cu reacția de fixare a complementului.

Reacția de fixare a complementului. Introdusă în studiul tifosului exantematic de Mosing, reacția de fixare a complementului a suferit continuu îmbunătățiri, devenind astăzi o metodă serologică de elecție pentru diagnosticul acestei afecțiuni; după Muroseva, ea dă un foarte mare procent de pozitivitate din a 6-a zi de boală, iar din a 9-a zi este pozitivă în toate cazurile.

Reacția permite, în afară de diagnosticul serologic propriu-zis, și identificarea germenului izolat pe cobai sau oul embrionat.

Produse necesare:

— ser de diagnosticat;
— antigen standard;

— antigen normal;
— ser standard;
— alexină;
— sistem hemolitic.

Serul de diagnosticat se recoltează de la bolnavi la începutul bolii şi apoi după 2 săptămîni; dacă este posibil, se va recolta şi o a treia probă de ser, după alte 2—3 săptămîni.

Serurile vor fi folosite în reacţie după inactivare timp de 30 de minute la 56°. Se recomandă conservarea serurilor la gheţar, pentru executarea paralelă a reacţiilor.

Antigenele standard se obţin uşor pe oul de găină embrionat. Atît antigenul solubil, cît şi antigenul corpuscular se prepară din sacul vitelin al embrionilor de găină, infectaţi experimental cu *R. prowazeki* sau *R. mooseri.*

În lipsa acestora se poate folosi ca antigen, cu bune rezultate, vaccinul antiexantematic fenicat, preparat din plămîn de şoarece.

O bună şi îndelungată conservare a antigenelor rickettsiene (solubile sau corpusculare) se obţine prin liofilizare.

Antigenul normal se prepară după aceeaşi tehnică ca şi antigenele standard, pe organisme normale, neinoculate.

Ca ser imun standard se foloseşte serul de convalescent, stocat, bineînţeles după controlul prealabil al pozitivităţii. Serurile se conservă la gheţar, de preferinţă congelate sau liofilizate.

Alexina şi sistemul hemolitic se obţin după tehnicile obişnuite.

Tehnica reacţiei. Reacţia de fixare se poate executa cu oricare din tehnicile obişnuite, dar cele mai bune rezultate se obţin cu tehnica Bengston modificată:

Antigenul, diluţiile de ser şi alexina sînt menţinute o oră la 37°, după care se adaugă sistemul hemolitic. Sistemul astfel obţinut se incubează din nou o oră la 37° şi apoi se ţine peste noapte la +4°, după care se citeşte rezultatul.

Rezultatele obţinute cu ajutorul reacţiei de fixare a complementului permit un diagnostic valabil chiar din a 6-a zi de boală.

Titrurile întîlnite sînt în general mari. Astfel, după Zarnea şi colab., între a 5-a şi a 10-a zi de boală 58% din bolnavi prezintă titruri peste 1/64; între a 10-a şi a 17-a zi 85% din bolnavi au titruri superioare faţă de 1/64, iar după a 17-a zi 100% din bolnavi au titruri de peste 1/64. De remarcat creşterea evidentă a titrului în perioada de stare a bolii şi în prima parte a convalescenţei; aceasta subliniază utilitatea studierii reacţiei în dinamică.

Anticorpii fixatori de complement se menţin la titruri valabile timp îndelungat; aceasta permite folosirea reacţiei şi retrospectiv.

Cu antigenul solubil, reacţia este pozitivă atît pentru tifosul epidemic, cît şi pentru cel endemic murin; cu antigenul corpuscular, reacţia devine „specifică de tip".

Reacţia izbuteşte să diagnosticheze, atît cazurile atipice, cît şi pe cele inaparente clinic; se evidenţiază astfel şi rolul său epidemiologic.

Reacţia de fixare a complementului poate fi folosită, după cum s-a arătat, şi pentru *identificarea unei rickettsii izolate pe animal sau oul embrionat.*

Produse necesare:

— materialul patogen de identificat;
— antigene standard;
— seruri standard;
— ser normal;
— alexină;
— sistem hemolitic.

Materialul patogen de identificat, constituit în mod obişnuit din creier de cobai recoltat la a 4-a zi de febră sau din sacul gălbenuşului embrionului de găină infectat experimental, se prelucrează ca şi antigenele standard.

Ca seruri imune standard se întrebuinţează, în mod obişnuit, seruri de convalescent sau seruri de cobai, stocate, menţinute congelate sau liofilizate după verificarea lor prealabilă.

Ceilalţi reageni, ca şi reacţia se execută după tehnica obişnuită.

În reacţie se foloseşte un martor de ser normal, iar în caz că serul imun nu a fost verificat de curînd, şi un martor cu antigene standard.

Rezultatele pozitive, apreciate bineînţeles în raport cu martorii, precizează diagnosticul.

De reţinut că prin folosirea antigenului corpuscular se poate face un diagnostic precis între *R. prowazeki* şi *R. mooseri*, în timp ce prin utilizarea antigenului solubil se poate preciza numai diagnosticul de tifos exantematic, fără aprecierea însă şi a tipului respectiv.

Reacţia de aglutinare a corpusculilor rickettsieni. În serul exantematicului s-au descris aglutinine faţă de rickettsiile cultivate în intestinul păduchelui şi care apar precoce, înaintea aglutininelor anti-*Proteus.*

Folosind diferite metode de purificare a rickettsiilor, cercetătorii au făcut din reacţia de aglutinare a corpusculilor rickettsieni o foarte bună metodă de diagnostic al bolii, ca și o valoroasă probă de identificare a germenilor izolați pe animal sau oul embrionat. Reacția poate fi folosită și pentru diagnosticul serologic al bolii experimentale, dat fiind că cobaiul, care nu elaborează aglutinine față de *Proteus*, elaborează precoce aglutinine specifice.

Produse necesare :

— suspensie de corpusculi rickettsieni purificați;
— serul de diagnosticat;
— serul imun standard.

Corpusculii rickettsieni se obțin după cultivare în oul embrionat, pregătindu-se de preferat după tehnica Zdrodowski.

Se recoltează membrana vitelină a embrionilor infectați experimental, se cîntărește și apoi se triturează îndelungat în flacoane cu perle de sticlă.

Pentru fiecare gram de membrană vitelină se adaugă 10 ml ser fiziologic cu 0,4% formol și 5% tamponfosfat cu pH = 7,4[1].

După 48 de ore de menținere la ghețar, emulsia se centrifughează 10 minute la 1 500 turații/min. Lichidul supernatant se recoltează într-o eprubetă specială, iar depozitul se reia în 3—5 ml ser fiziologic și se centrifughează de asemenea 10 minute la 1 500 turații/min. Supernatantul se recoltează și se unește cu supernatantul obținut după prima centrifugare, după care se recentrifughează prelungit (o oră la 3 000 turații/min.).

Depozitul obținut se suspendă în ser fiziologic cu adaos de formol și tamponfosfat (1/2 din volumul inițial), după care se tratează rapid cu eter (cantitate egală). Se agită puternic, după care se lasă în repaus 10 minute. Se recoltează faza apoasă și se tratează din nou cu eter. Această operație se repetă de 5 ori. După a 5-a prelucrare cu eter, faza apoasă care conține rickettsiile se supune unui vid slab, pentru eliminarea eterului, după care se centrifughează 1—2 ore la 2 500—3 500 turații/min.

Depozitul se reia într-un sfert de volum de ser fiziologic cu 0,20% formol și 5% tamponfosfat, cu pH = 7,2.

Concentrația antigenului se stabilește după standard la 500 000 000—1 000 000 000 corpusculi/ml.

Serul de diagnosticat va fi prelevat în 1—2 reprize, ca pentru celelalte reacții serologice. În reacție, serul va fi folosit după inactivare timp de 30 de minute, la temperatura de 56°. Se recomandă executarea reacției în același timp cu toate probele de ser recoltat.

Ca ser imun standard se folosește serul de convalescent, stocat la ghețar, de preferință congelat sau liofilizat.

Tehnica reacției este simplă, mai ales cînd se efectuează pe lamă (tehnica Castaneda sau Psenicinov-Raiher).

Tehnica Castaneda. Din diluții crescînde din serul de diagnosticat (1/20, 1/40... 1/640), se pune cîte o picătură pe lame perfect curate, după care se adaugă o picătură de antigen. Lamele se agită ușor (autorul propune discul rotator al unui patefon), timp de 5—10 minute, după care rezultatele se citesc cu ajutorul microscopului.

În cazurile pozitive, aglutinarea este evidentă.

Tehnica Psenicinov-Raiher. Din diluții crescînde de ser, se pune cîte o picătură pe lame de sticlă perfect curate. Se adaugă la fiecare picătură de ser o picătură de antigen și rapid se amestecă printr-o rotație ușoară a lamei. Lamele se așază într-o cameră umedă și se introduc în termostat, la 37°, pentru o oră.

După acest timp, fiecare picătură este întinsă și frotiul obținut se colorează cu metoda Romanowski-Giemsa. Preparatul colorat se examinează cu un obiectiv cu imersie.

În caz de reacție pozitivă, examenul microscopic va arăta o aglutinare netă. În caz negativ, antigenul va fi în mod egal răspîndit în preparat.

Rezultatele reacției de aglutinare a corpusculilor elementari rickettsieni sînt pozitive începînd, în mod obișnuit, cu a 5-a zi de boală (titrul mediu 1/100), iar titrul crește evident în zilele următoare. Reacția este egal pozitivă la primoinfecțiile exantematice, ca și la bolnavii cu recidivă; la vaccinații antiexantematic prezintă titruri mai joase și nepersistente. Astfel la 6 luni de la vaccinare, titruri valabile se întîlnesc numai la 30% din vaccinați.

Trebuie precizat că reacția poate fi comod folosită și pentru identificarea unui germen izolat pe animal sau oul embrionat.

În acest scop, suspensia de corpusculi rickettsieni se prepară din produsul patogen de identificat, iar reacția se execută în mod obișnuit cu seruri imune verificate.

---

[1] La 1 litru apă distilată se adaugă 0,91 g ($KHPO_4$) și 10,69 g ($NaHPO_4$).

Concluzii

Diagnosticul de laborator al tifosului exantematic se stabilește în faza de debut a bolii, prin izolarea germenului caracteristic, după 5—6 zile de boală, prin probe serologice.

Izolarea germenului caracteristic se face comod prin inocularea de sînge de la un bolnav acut, intraperitoneal, la cobai, animal care reacționează în caz pozitiv printr-o febră moderată. În cazul *Rickettsiei mooseri*, febra se poate acompania și de o reacție scrotală caracteristică. Tulpina izolată pe cobai va putea fi menținută în sacul vitelin al embrionului de găină.

Pentru identificarea germenului izolat se folosesc metode morfologice, dar mai ales serologice, și în special reacția de fixare a complementului.

Această reacție, împreună cu reacția de aglutinare a corpusculilor elementari, superioară reacției Weil-Felix, constituie reacțiile de elecție pentru diagnosticul tifosului exantematic, datorită pe de o parte precocității pozitivității lor, pe de altă parte caracterului de tip, spre deosebire de majoritatea celorlalte reacții serologice, cu valoare de grup. Cele mai bune rezultate se obțin, ca de altfel și în alte inframicrobioze, prin studiul anticorpilor în dinamică.

Pentru diferențierea de rezultate pozitive ocazionate de vaccinarea antiexantematică, în realitate reacții pozitive puțin persistente și la titruri joase, se va utiliza reacția Minchevici-Kudicke-Steuer, constant negativă la vaccinați și pozitivă, în procent foarte mare, la bolnavi, în special după al 2-lea septenar.